Die Zustandsform des Kalziums im Serum und die Fällung der Knochensalze

Ein Beitrag zu den Untersuchungen über die Kalkablagerung in tierischen Geweben.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
genehmigt von der Philosophischen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

von
Dorothea Hofmann
aus Leipzig

Tag der Prüfung: 17. Mai 1934

Tag der Promotion: 27. Juli 1934

Druck von Frommhold & Wendler, Leipzig
D. R. G. M.
1934

499

Referenten: Prof. Dr. S c h l e n k
Prof. Dr. B o d e n s t e i n

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Einleitung: Problemstellung und Zielsetzung	5
A. Diskussion der Literatur über die Zustandsform des Kalziums im Serum	6
I. Die Übersättigung des Serums	6
II. Die unbekannte Bindungsform des Kalziums	9
B. Untersuchungen über die Fällung und Lösung der Knochensalze unter physiologischen Bedingungen	12
I. Versuche mit Modellösungen	13
II. Versuche mit Serum und Serumultrafiltraten	21
C. Experimenteller Teil	25
I. Untersuchungsmethoden	25
a) Behandlung	25
b) Substrate	25
c) Bodenkörper	27
d) Analysen	28
II. Ergebnisse	30
a) Versuche mit Modellösungen (zu B I)	30
b) Versuche mit Serum und Serumultrafiltraten (zu B II)	35
c) Versuche über die Wirkung verschiedener Adsorbentien auf den Gehalt von Serum und Modellösungen (zu A II)	38
Zusammenfassung	39
Literaturverzeichnis	42
Lebenslauf	44

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550810_0153

Einleitung.

Problemstellung und Zielsetzung.

Seitdem chemische Methoden zum Studium physiologischer Probleme herangezogen wurden, hat die Erforschung der normalen und pathologischen Gewebsverkalkung große Fortschritte erzielt. Zahlreiche Theorien sind aufgestellt worden, um diesen Vorgang zu erklären; jedoch konnte bisher keine dieser Theorien sich endgültig durchsetzen. Vor einiger Zeit hat Kleinmann (1) unter einheitlichen Gesichtspunkten eine Übersicht über die bestehenden Verkalkungstheorien gegeben. Auf diese zusammenfassende Darstellung soll hier verwiesen werden.

Einen breiten Raum in der historischen Entwicklung nimmt eine Verkalkungstheorie ein, die Kleinmann als die "Theorie der Löslichkeitsverhältnisse" bezeichnete. Nach dieser Auffassung soll das Serum an tertiärem Kalziumphosphat und vielleicht auch an Kalziumkarbonat übersättigt sein. Der Vorgang der Gewebsverkalkung soll auf einer Aufhebung dieses Übersättigungszustandes beruhen oder durch ihn eingeleitet werden. Zahlreiche Arbeiten sind veröffentlicht worden, die diese Theorie stützen (Hofmeister (2), Holt, La Mer und Chown (3),Howland (4), Kramer (5),). Aber in letzter Zeit mehren sich wieder die Stimmen der Autoren, die eine Übersättigung des Serums an Knochensalzen ablehnen (Freudenberg und György (6), Hastings, Murray und Sendroy (7),). Klinke (8) kommt auf Grund seiner Arbeiten zu der Annahme, daß im Serum eine ultrafiltrable Kalziumkomplexverbindung vorliegt, die ausschlaggebend für den Verkalkungsvorgang sein soll. Die Existenz dieser Verbindung ist aber noch stark umstritten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die erneute Prüfung sein,ob das Serum an Knochenerden übersättigt ist; hieraus ergäbe sich, daß die Gewebsverkalkung entweder auf diese Übersättigung zurückgeführt werden kann oder daß für ihre Erklärung die Annahme der Existenz einer Kalziumkomplexverbindung im Sinne Klinkes notwendig ist.

A). Diskussion der Literatur über die Zustandsform des Kalziums im Serum.

I). Die Übersättigung des Serums.

Der verhältnismäßig hohe Gehalt des Serums an Kalzium, anorganischem Phosphor und Kohlensäure hatte schon frühzeitig zu der Vermutung geführt, daß das Serum an den schwerlöslichen Knochensalzen Kalziumkarbonat und tertiärem Kalziumphosphat übersättigt sei. Einer Prüfung dieser Frage standen aber viele Schwierigkeiten im Wege. Es fehlte jede genaue Angabe über die Löslichkeit der beiden Salze. Für die Aufstellung ihres Löslichkeitsproduktes war die Kenntnis der Dissoziationskonstanten von Kohlensäure und von Phosphorsäure notwendig, denn Kalziumkarbonat und Kalziumphosphat unterliegen der Hydrolyse; nur ein Teil der gelösten Anionen geht in das Löslichkeitsprodukt ein. Um Aussagen über den Sättigungsgrad des Serums machen zu können, ist weiter die Ionenaktivität bezw. die Abhängigkeit des stöchiometrischen Löslichkeitsproduktes der Knochensalze von der Gesamtionenkonzentration μ zu berücksichtigen. Dabei berechnet sich im hinreichend verdünnten Medium μ nach der Formel

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{i=n} c_i z_i ,$$

in der c_i die molaren Konzentrationen sämtlicher in der Lösung vorhandener Ionen und z_i ihre Wertigkeit bedeuten.

Die ersten, die die Größe der Löslichkeitsprodukte von Kalziumkarbonat und Kalziumphosphat in Abhängigkeit von der Gesamtionenkonzentration der Lösung bestimmten, waren Holt, Le Mer und Chown (3). Etwas später korrigierten Hastings, Murray und Sendroy (7) die von Holt und Mitarbeiter gefundenen Werte, indem sie die Aktivitätsbedingtheit der Dissoziationskonstanten von Kohlensäure und Phosphorsäure berücksichtigten. Sie fanden für den negativen Exponenten des Löslichkeitsproduktes von Kalziumkarbonat, pLp $CaCO_3$, bei 38 Grad den Wert

$$pLp\ CaCO_3 = 8{,}58 - \frac{4{,}94\sqrt{\mu}}{1 + 1{,}61\sqrt{\mu}}$$

und für den negativen Exponenten des Löslichkeitsproduktes von tertiärem Kalziumphosphat, pLp $Ca_3(PO_4)_2$, bei 38 Grad den Wert

$$pLp\ Ca_3(PO_4)_2 = 30{,}95 - \frac{17{,}40\sqrt{\mu}}{1 + 1{,}48\sqrt{\mu}} .$$

Wird die Ionenstärke μ des Serums zum durchschnittlichen Wert von

μ = 0,160 angenommen (H a s t i n g s und Mitarbeiter), so errechnet sich das stöchiometrische Löslichkeitsprodukt von Kalziumkarbonat und Kalziumphosphat im Serum zu

$$Lp\ CaCO_3 = 10^{-7,4}$$

$$\text{und} \quad Lp\ Ca_3(PO_4)_2 = 10^{-26,56}.$$

Obwohl im Serum ca 45 % des gesamten Kalziums nach den Untersuchungen von R o n a und T a k a h a s h i (9)+) nicht ultrafiltrabel sind und wahrscheinlich an Eiweiß gebunden vorliegen, würde der Rest genügen, um das Löslichkeitsprodukt von Kalziumkarbonat und Kalziumphosphat zu überschreiten. K l e i n m a n n berechnete nämlich, daß bei einem durchschnittlichen Gehalt des Serums an Kohlensäure und anorganischem Phosphor im Falle einer Sättigung an Kalziumkarbonat nur 1,56 mg% Kalzium, im Falle einer Sättigung an tertiärem Kalziumphosphat sogar nur ca. 0,45 mg % Kalzium ionisiert vorliegen können. Versuch von H a s t i n g s und Mitarbeiter lassen die Frage offen, ob die Ionenstärke μ des Serums infolge seines Proteingehaltes nicht 0,240 beträgt. Damit würde sich der Kalziumgehalt des Serums im gesättigten Zustande auf 2,3 mg % bezw. 0,7 mg % erhöhen (eigene Berechnung und Berechnung von K l i n k e). Da aber im Serum etwa 6 mg % Kalzium ultrafiltrabel sind, müßte, falls das ultrafiltrable Kalzium vollständig ionisiert ist, eine Übersättigung des Serums an beiden Knochensalzen vorliegen.

Die errechnete Übersättigung des Serums suchten nun H o l t , L a M e r und C h o w n sowie H a s t i n g s und Mitarbeiter dadurch nachzuweisen, daß sie Serum mit festem Kalziumkarbonat und tertiärem Kalziumphosphat animpften. S e n d r o y und H a s t i n g s schüttelten das Serum zunächst mit Kalziumkarbonat und fanden, daß sich die Zusammensetzung des Serums dadurch nicht veränderte. Sobald sie jedoch Kalziumphosphat als Bodenkörper benutzten, beobachteten sie eine bedeutende Abnahme des Kohlensäure- und des Kalziumgehaltes des Serums, während der Gehalt an anorganischem Phosphor nicht oder in einigen Fällen nur sehr wenig abnahm. In gleicher Versuchsanorsnung fanden H o l t und Mitarbeiter neben einer Abnahme des Kalziumgehaltes auch eine

---

+) Der angegebene Wert über die Menge des nicht ultrafiltrablen Kalziums stammt aus neueren Arbeiten (G r e e n b e r g und G u n t h e r (10), B e n j a m i n und H e s s (11),).-R o n a und T a k a h a s h i bestimmten die Menge des eiweißgebundenen Kalziums im Serum mittels Dialyse und fanden etwas kleinere Werte.

bedeutendere Abnahme des Phosphorgehaltes. K l e i n m a n n stellte gleichfalls fest, daß bei Anwendung geringer Mengen tertiären Kalziumphosphats nicht nur der Kalziumgehalt des Serums vermindert wird, sondern auch der Gehalt an anorganischem Phosphor. Eine Übersicht über die verschiedenen bisher erhaltenen Resultate gibt Tabelle I.

T a b e l l e I.

Wirkung von festem tertiären Kalziumphosphat auf den Gehalt von Serum. - Bisherige Ergebnisse.

Autor	Kalzium-phosphat	Ca mg% Vor d.	P mg% Versuch	Ca mg% Nach d.	P mg% Versuch	Ca/P ausgef.
Holt	? mg	10,3	3,2	1,8	1,5	5,9
"	? mg	10,2	3,5	2,5	1,5	3,8
"	? mg	11,0	3,4	2,7	2,1	6,4
Hastings, 1% des Serums (?)		12,8	2,5	2,5	2,7	!
Klinke+)	? mg	11,2	3,6	4,4	3,1	13,6
" ++)	50mg/12ccm S.	11,6	3,1	5,2	3,1	!
" ++)	50mg/12ccm S.	10,4	2,8	3,2	2,5	23,0
Kleinmann	5mg/20ccm S.	9,8	3,3	10,1	3,3	---
"	5mg/20ccm S.	9,8	3,3	10,0	3,3	---
"	50mg/20ccm S.	9,8	3,3	8,0	3,0	6,0
"	50mg/20ccm S.	9,8	3,3	7,5	3,0	7,6
"	500mg/20ccm S.	9,8	3,3	3,7	4,3	!
"	500mg/20ccm S.	9,8	3,3	3,5	4,2	!

Obwohl die Verminderung des anorganischen Phosphors im Serum nach dem Schütteln mit tertiärem Kalziumphosphat in den Versuchen von H o l t, L a M e r und C h o w n nicht ausreichte, um eine Ausfällung des Kalziums als tertiäres Kalziumphosphat zu erklären, nahmen diese Autoren doch auf Grund ihrer Resultate an, daß das Serum an tertiärem Kalziumphosphat übersättigt sei und daß die Aufhebung des Übersättigungszustandes die Verkalkung verursacht. Sie stellten fest, daß die Fällung von tertiärem Kalziumphosphat als eine Reaktion 5ter Ordnung sehr langsam verlaufen muß und daß infolgedessen ein metastabiler, übersättigter Zustand des Serums möglich sei. Auch K l e i n m a n n kam auf Grund seiner Versuchsergebnisse zu dem Schluß, daß neben komplizierten Umsetzungen mit dem Bodenkörper die Abnahme von Kalzium u n d Phosphor für Aufhebung der Übersättigung sprach. H a s t i n g s und Mitarbeiter sowie K l i n k e lehnten dagegen eine Übersättigung des Serums an Kalziumphosphat ab, weil in ihren Versu-

+) (8), Ergebn. d. ges. Phys.
++) (8), Bioch.Z.213/177 (1928).

chen im wesentlichen nur der Kalzium- und Kohlensäuregehalt des Serums vermindert wurde. Eine Übersättigung des Serums an Kalziumkarbonat sei aber wiederum wegen des negativen Ausfalls der Animpfversuche mit Kalziumkarbonat nicht möglich. Eine Erklärung für den Vorgang der Kalzium- und Kohlensäureverminderung konnten H a s t i n g s und Mitarbeiter nicht geben.

II). D i e u n b e k a n n t e B i n d u n g s f o r m d e s K a l z i u m s .

Zur Erklärung des Verkalkungsvorganges nahm K l i n k e an, daß im Serum eine ultrafiltrable, negativ geladene Kalziumkomplexverbindung vorhanden sei, die vom Knorpelgewebe adsorbiert wird und damit die Verkalkung einleitet. Das Kalzium in dieser hypothetischen Verbindung soll an eine organische Komponente gebunden sein; G r e e n w a l d (12) sowie G o r d o n und Mitarbeiter (13) vermuteten, daß diese Komponente in Beziehung zu dem Parathyreoidhormon stehe. Auch wurde die Möglichkeit erwogen, ob Zitronensäure oder Gallensäure als organische Komponente an diesem Komplex beteiligt seien, weil auch Milch mit ihrem relativ hohen Gehalt an zitronensauren Salzen und die Galle in ihren Dialysaten mehr Kalzium und Phosphat gelöst enthalten, als mit der Löslichkeit des tertiären Kalziumphosphats in Einklang zu bringen ist.

Da bisher eine organische Kalziumkomplexverbindung im Serum nicht nachgewiesen werden konnte, stützte K l i n k e seine Beweise für die Existenz dieser Verbindung zunächst darauf, daß eine Übersättigung des Serums an Knochensalzen abzulehnen sei und daß infolgedessen der größte Teil des ultrafiltrablen Kalziums nicht als Kalzium i o n e n sondern in einer anderen Form vorliegen müsse. Eine Übersättigung widerlegte K l i n k e einmal damit, daß der vermeintliche Übersättigungszustand durch Ausfrieren des Serums nicht aufgehoben würde, während in einer an Kalzium- und Phosphationen übersättigten "Ringer"lösung nach dem Ausfrieren eine Verminderung des Kalzium- und Phosphatgehaltes festzustellen war. Ferner sprach gegen Übersättigung die Tatsache, daß die Abnahme des Kalzium-, Phosphor- und Kohlensäuregehaltes im Serum nicht nach Animpfen mit Kalziumkarbonat, sondern nur mit tertiärem Kalziumphosphat gelang und daß sie nicht nach stöchiometrischen Gesetzmäßigkeiten verlief. Die Verminderung des Kalziumgehaltes nach dem Schütteln mit festem tertiären Kalziumphosphat erklärte K l i n k e damit, daß die hypothetische Kalziumverbindung vom festen Kalziumphosphat und von verschiedenen ande-

ren Adsorbentien wie auch vom Knorpelgewebe beim Verkalkungsvorgang leicht adsorbiert wird; die Art der wirksamen Adsorbentien veranlaßte ihn zu der Vermutung, daß dieser Kalziumkomplex negativ geladen sei. Überführungsversuche mit Serumultrafiltraten sowie die von B e r n h a r d und B e a v e r (14) bei der Elektrodialyse von Serum beobachtete Wanderung von Kalzium an die Anode schienen seine Auffassung zu bestätigen.

Die Beweise für die Existenz einer diffusiblen Kalziumverbindung sind schon früher von K l e i n m a n n und erst kürzlich wieder von D.M.G r e e n b e r g und L.G r e e n b e r g (15) heftig angegriffen worden. Während die Kleinmann'schen Versuche in erster Linie für Übersättigung sprachen, wendeten sich D.M.G r e e n b e r g und L.G r e e n b e r g gegen die citierten Versuche, die den negativen Charakter des hypothetischen Kalziumkomplexes zu bestätigen schienen. Sie konnten bei Wiederholung der Versuche von B e r n h a r d und B e a v e r in keinem Falle eine Anreicherung von Kalzium an der Anode nachweisen, und sie erklärten die Wanderung von Kalzium an die Anode in 7 unter den 26 Versuchen von B e r n h a r d und B e a v e r damit, daß in diesen Fällen die Membranen nicht eiweißdicht waren. Auch die Überführungsversuche von K l i n k e können das Vorhandensein eines negativen Kalziumkomplexes nicht beweisen, da die verwendeten Serumultrafiltrate ebenfalls nicht eiweißfrei waren.

Die Klinke'schen Versuche über die Adsorbierbarkeit des Serumkalziums müssen aber gleichfalls als nicht beweisend angesehen werden. K l i n k e zeigte, daß gewisse Adsorbentien wie Bariumsulfat und Aluminiumhydroxyd aus dem Serum Kalzium zu adsorbieren vermögen, während Kohle und Kaolin dazu nicht in der Lage sind. Er führte an, daß Bariumsulfat und Aluminiumhydroxyd Adsorbentien für Anionen sind und stellte diesen Körpern das tertiäre Kalziumphosphat zur Seite, welches nach den angeführten Versuchen auch eine Verminderung des Kalziumgehaltes im Serum hervorruft+).

Diese Adsorptionsversuche wurden von verschiedenen Autoren wiederholt. K l e i n m a n n konnte zunächst eine Adsorption des Serumkalziums durch $Al(OH)_3$ und $BaSO_4$ nicht feststellen; K l i n k e wendete dagegen ein, daß nur frischgefällte, feuchte Salze Adsorptionswirkung zeigen. Für die Adsorptionswirkung des

---

+) K l i n k e bezeichnete $Ca_3(PO_4)_2$, $Al(OH)_3$ und $BaSO_4$ als "negative" Adsorbentien, Kaolin als "positives" Adsorbens. Da in der Kapillarchemie unter "negativen" Adsorbentien alle diejenigen Körper verstanden werden, die nicht gelöste Stoffe sondern Lösungsmittel adsorbieren, soll in dieser Arbeit die Bezeichnung "negatives Adsorbens" vermieden werden.

trockenen tertiären Kalziumphosphats macht er "gewisse chemische Affinitäten" verantwortlich. Wahrscheinlich sind aber die bei K l e i n m a n n verwendeten Mengen Adsorbens nur zu klein gewesen, denn vor einiger Zeit gelang es B e n j a m i n und H e s s (11), mit größeren Mengen $BaSO_4$ viel Kalzium und anorganischen Phosphor aus dem Serum zu adsorbieren. Eigene Versuche mit trockenem $BaSO_4$, $Al(OH)_3$ und Al_2O_3 bestätigten (vergl.Tabelle XV.), daß bei genügender Menge Adsorptionsmittel eine weitgehende Adsorption von Kalzium und anorganischem Phosphor erreicht wird. Die Tatsache, daß Al_2O_3,welches aus $Al(OH)_3$ durch Glühen gewonnen wird, stärker adsorbierend wirkte als $Al(OH)_3$, zeigt, wie kompliziert die Erscheinungen an Phasengrenzflächen sind und wie wenig sich Adsorptionswirkungen dazu eignen, in einem so undurchsichtigen Falle als Beweismittel herangezogen zu werden.

Auch beim negativen Ausfall der Adsorptionsversuche mit Kaolin liegen die Verhältnisse nicht so eindeutig, daß dieser Befund als Beweis für die Existenz eines negativen Kalziumkomplexes herangezogen werden kann. Da Kaolin als Mineral nicht im frischgefällten Zustande verwendet werden kann, hätte K l i n k e von vorn herein erwarten müssen, daß damit keine Wirkung erzielt wird. Aus eigenen Versuchen mit größeren Mengen gut gereinigtem Kaolin sei hier vorweggenommen (vgl. S.39), daß neben einer geringfügigen Adsorption von Kalzium ziemlich weitgehend anorganischer Phosphor aus dem Serum entfernt wurde.Auch konnte ich bei meinen Versuchen eine auffallend große Adsorption von Lösungsmittel beobachten, so daß Kaolin im kapillarchemischen Sinne als "negatives Adsorbens" bezeichnet werden kann. -- Im Hinblick auf die komplizierten Vorgänge, die sich beim Einbringen des Kaolins in Serum abspielen, erscheint es nicht richtig, daraus irgendwelche Schlüsse auf das Vorhandensein eines n e g a t i v geladenen Kalziumkomplexes zu ziehen.

Weiter sprechen gegen die Klinke'schen Beweise die Adsorptionsversuche von K l e i n m a n n und von B e n j a m i n in anorganischen Lösungen. Diese Autoren stellten Lösungen her,die die anorganischen Bestandteile des Serums bezw.des Serumultrafiltrats enthielten und die an Kalziumkarbonat und Kalziumphosphat übersättigt waren. Aus diesen Lösungen konnten K l e i n m a n n mit $Al(OH)_3$ und $BaSO_4$ und B e n j a m i n mit $BaSO_4$ Kalzium und Phosphat "adsorbieren" oder besser entfernen; dabei war das Verhältnis des "adsorbierten" Kalziums zum "adsorbierten" Phosphat nicht konstant sondern unterlag großen Schwankungen (vergl.auch Versuche Tabelle XV.). Gleichzeitig konnte B e n j a m i n zeigen, daß $BaSO_4$ aus einer Lösung,die nur Phosphat und kein Kalzium

enthielt, das Phosphat entfernte. Die Menge des entfernten Phosphats war außerdem in hohem Maße von der ursprünglich in der Lösung vorhandenen Phosphatmenge abhängig. Infolgedessen sind die "Adsorptions"versuche mit $BaSO_4$ derartig unübersichtlich, daß sie keine Entscheidung zulassen, inwieweit ein Komplex adsorbiert wird, oder ob der zugegebene Bodenkörper die Übersättigung der Lösung aufhebt. Die Aufhebung einer Übersättigung kommt bekanntermaßen nicht nur durch Animpfen zustande, sondern kann auch durch verschiedene mechanische Wirkungen ausgelöst werden. Wir wissen, daß z.B. Staubteilchen in einer Lösung in diesem Sinne wirksam sind. Auch spielen Größe und Zustand der Phasengrenzflächen dabei eine große Rolle. So konnte ich aus anorganischen Lösungen, die an Kalziumphosphat gleichstark übersättigt waren wie das Serum (berechnet auf dessen gesamten Kalziumgehalt), tertiäres Kalziumphosphat durch Schütteln mit Glasperlen ausfällen; Schütteln ohne Glasperlen hob den Übersättigungszustand der Lösung nicht auf.Auch nach monatelangem Aufbewahren einer solchen übersättigten Lösung fand keine Ausfällung statt.

B e n j a m i n schloß aus den Ergebnissen seiner Adsorptionsversuche, daß in künstlichen anorganischen Serumultrafiltraten ein Kalzium-Phosphorkomplex vorliegt, "which is similar to, and probably identical with the filtrable adsorbable calcium - phosphorus complex in serum". Da diese künstlichen Ultrafiltrate anderseits übersättigte Lösungen darstellten, ist damit die Frage einer Übersättigung des Serums an Knochensalzen von neuem aufgerollt.

B. U n t e r s u c h u n g e n ü b e r d i e F ä l l u n g u n d L ö s u n g d e r K n o c h e n s a l z e u n t e r p h y s i o l o g i s c h e n B e d i n g u n g e n.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Ausfällung[+)] des Kalziums aus Serum nach Zugabe von festem Kalziumphosphat in Abhängigkeit von der Bodenkörpermenge vorgenommen werden.

Bisher hatte man der Menge des zugegebenen festen Kalziumphosphats keine weitere Beachtung geschenkt, da man nur ein Animpfen des scheinbar übersättigten Serums bezweckte. H o l t, L a M e r

---

+) Unter "Ausfällung" soll hier und im folgenden immer nur der Vorgang der Konzentrationsverminderung verstanden werden, ganz gleich, ob er durch echte Ausfällung infolge Übersättigung oder durch Adsorption an den Bodenkörper erklärt werden kann.

und C h o w n machen daher keine Angaben über die Menge tertiären Kalziumphosphats, die sie dem Serum zusetzten. Bei H a s t i n g s und Mitarbeiter betrug im anorganischen Substrat das zugesetzte Kalziumphosphat 1% der Flüssigkeitsmenge; man kann vermuten, daß die Mengen bei den Serumversuchen ebenso groß waren. K l i n k e gab nur bei einem Teil seiner Versuche an, mit welchen Mengen Kalziumphosphat als Bodenkörper gearbeitet wurde (Tabelle I. S.8.).

Von K l e i n m a n n waren erstmalig Ausfällversuche aus Serum in Abhängigkeit von verschiedenen Mengen Bodenkörper ausgeführt worden. Bei den Versuchen konnte die Kohlensäure des Serums in die Luft entweichen. Damit wollte K l e i n m a n n ein physiologisches Modell für die Verkalkung geben, bei der die Umsetzungen nicht unter Ausschluß der Gasphase stattfinden. Die Versuche konnten daher - worauf schon K l e i n m a n n in seiner Arbeit nachdrücklich hinwies - nur für die Richtung des verlaufenden Prozesses maßgebend sein und keinen Einblick in ihren stöchiometrischen Verlauf gestatten.Es trat nämlich in den Kleinmann'schen Versuchsreihen eine pH-Änderung bis zu 0,5 nach der sauren Seite auf. Infolgedessen stieg der Partialdruck der freien Kohlensäure im Substrat um das Dreifache an; die Abgabe der Kohlensäure an den Gasraum mußte daher bei den Versuchen mit kleinerem pH gegenüber den alkalischeren Versuchen beschleunigt gewesen sein.

Um stöchiometrisch die Ausfällung zu verfolgen und Kohlensäureverluste zu vermeiden, wurden meine Versuche über die Ausfällung des Kalziums aus Serum und anorganischem Substrat in Abhängigkeit von der Bodenkörpermenge u n t e r P a r a f f i n ausgeführt. Auf diese Weise wurde ein abgeschlossenes System von nur zwei Phasen geschaffen, bei dem die Menge der in der einen Phase vorhandenen Stoffe einen direkten Schluß auf die Mengen der in der anderen Phase vorhandenen Stoffe zuließen. Ein Kohlensäureverlust infolge Anwachsen des Kohlensäuredruckes kam bei allen angestellten Versuchreihen auch bei abnehmendem pH nicht in Frage, da der Gehalt des Serums und der anorganischen Substrate an G e s a m t kohlensäure stets geringer war, als der Löslichkeit der f r e i e n Kohlensäure - 24 mmol/l unter physiologischen Bedingungen - entspricht.

I. V e r s u c h e m i t M o d e l l l ö s u n g e n .

Ein wesentlicher, bisher unwiderlegter Einwand gegen die Übersättigung des Serums an Knochensalzen betraf das Fehlen stöchio-

metrischer Gesetzmäßigkeiten bei der Ausfällung von Kalzium, anorganischem Phosphor und Kohlensäure aus Serum. Ich untersuchte daher zunächst die Ausfällung aus anorganischen Lösungen, die an Kalziumkarbonat und tertiärem Kalziumphosphat übersättigt waren. Der Vergleich mit Serumversuchen gleicher Versuchsanordnung sollte dann später entweder den Beweis für eine Übersättigung des Serums oder für Adsorption eines Kalziumkomplexes erbringen.

Als übersättigte Lösungen verwendete ich sogenannte Modellösungen, die in ihrer Zusammensetzung die Ionenverhältnisse des Serums möglichst ähnlich wiedergaben. Die ionale Konzentration μ dieser Lösungen betrug stets 0,160; außerdem waren sie mit Bikarbonat-Phosphat oder mit Veronal-Azetat gut gepuffert. Während der Phosphatgehalt und der Kohlensäuregehalt+) der Modellösungen dem Gehalt des Serums angepaßt werden konnte, war mit der Festlegung einer bestimmten Kalziumionenkonzentration eine gewisse Willkür verbunden, da ja dieselbe im Serum unbekannt ist. Ich wählte die Kalziumkonzentration der Serumultrafiltrate (ca.6 mg%.). Zwar zeigten später die Serumversuche, daß auch eiweißgebundenes Kalzium - möglicherweise nach vorangegangener Dissoziation - mit aus dem Serum entfernt worden war. Trotzdem erhöhte ich die Kalziumkonzentration der Modellösung nicht, weil aus einer Modellösung von 10 mg % Kalzium in Gegenwart von 3 mg % Phosphor bereits beim Schütteln mit Glasperlen Kalziumphosphat ausfiel.

Um diese übersättigten Modellösungen anzuimpfen und Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat auszufällen, schüttelte ich sie unter Paraffinabschluß bei 38 Grad 20 Stunden lang mit verschiedenen Mengen tertiären Kalziumphosphats als Bodenkörper. Aus der Analyse des Substrats vor und nach dem Versuch konnte dann ersehen werden, welche Mengen im Laufe des Versuchs ausgefällt worden waren.

Meine Versuche zeigen (Tabelle II, S.31), daß die Ausfällung auch im anorganischen Substrat nicht nach stöchiometrischen Gesetzen verläuft; bei sämtlichen Versuchen wurde ein Überschuß an Anionen aus der Lösung entfernt. Außerdem hing die Menge des aus der Lösung entfernten Kalziums, Phosphats und der Kohlensäure von der Menge des Bodenkörpers ab. Während der Kalziumgehalt und der Kohlensäuregehalt mit steigender Bodenkörpermenge abnahm, trat dieses beim Phosphatgehalt nur bei Versuchen mit kleineren Bodenkörpermengen ein (5,20,200 mg); bei 2000 mg Bodenkörper stieg der

---

+) In Anpassung an das in den Serumversuchen angewandte, abgestandene Serum wurde der Kohlensäuregehalt der Modellösung mit etwa 20 mmol/l etwas niedriger gehalten als in frisch entnommenem Serum.

Phosphatgehalt über den Anfangswert an.

Die Unabhängigkeit der Phosphatzunahme der Modellösung von ihrem Kohlensäuregehalt bewies eine gleiche Versuchsreihe mit einer bikarbonatfreien Modellösung. Diese enthielt physiologischen Veronal-Azetatpuffer, da das Phosphat,als Puffer zugegeben, allein zu schwach war,um die Lösung gut zu puffern. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit bikarbonathaltiger (Tabelle II) und bikarbonatfreier Modellösung (Tabelle III) läßt die Annahme einer Austauschadsorption zwischen Kohlensäure und Phosphat,wie sie K l e i n m a n n auf Grund der Phosphatzunahme und der Kohlensäureabnahme aus seinen Versuchen ableitete, nicht aufrechterhalten.

Die Abnahme des Kohlensäuregehaltes der Modellösung mit steigender Bodenkörpermenge bei der Versuchsreihe Tabelle II läßt sich durch Adsorption von Kohlensäure an das feste Kalziumphosphat gut erklären. Wie bei Adsorptionswirkungen zu erwarten war, unterschieden sich Kalziumphosphate verschiedener Herkunft sehr stark in ihrem Adsorptionsvermögen. Während bei dem käuflichen Präparat+) die Bikarbonatkonzentration der Lösung maximal um 1,8 mmol/l erniedrigt wurde und der Wert pIp $CaCO_3$ auf 7,7 anstieg (vergl. Tabelle II; pLp $CaCO_3$ = 7,4), wurde mit dem selbsthergestellten Kalziumphosphat eine Verminderung der Bikarbonatkonzentration um 4,3 mmol/l und ein Anwachsen des Wertes pIp $CaCO_3$ auf 9,0 beobachtet++). Auch Knochenpulver aus veraschtem und unveraschtem Knochenmaterial adsorbierte Kohlensäure in hohem Maße (vergl.Serumversuch Tabelle XII, S.36). Mit einer Adsorption der Kohlensäure an tertiäres Kalziumphosphat ist gleichfalls folgende Beobachtung von H a s t i n g s und Mitarbeitern vereinbar: Bei Gegenwart von festem Kalziumkarbonat u n d festem Kalziumphosphat fanden sie das Löslichkeitsprodukt des Kalziumkarbonats niedriger als bei Gegenwart von festem Kalziumkarbonat allein. H a s t i n g s erklärte aber diese Erscheinung als eine Folge unbekannter Neutralsalzeffekte. -- Bei dem Versuch, eine Adsorptionsisotherme für die verschiedenen Präparate tertiären Kalziumphosphats und für die Knochenpulver aufzustellen, zeigte es sich jedoch, daß ihr Adsorptionsvermögen zu gering und die gewählten Mengen Bodenkörper voneinander zu verschieden waren, als daß das Freundlich'sche Gesetz vollkommen erfüllt war.

Ferner zeigte das tertiäre Kalziumphosphat auch gegenüber

+) Fraenkel und Landau "zur Analyse".
++) pIp ist der negative Exponent des Ionenproduktes, pLp der des Löslichkeitsproduktes; bei Sättigung gilt daher: pIp = pLp.

anderen Anionen ein auffallendes Adsorptionsvermögen. Es gelang mir selbst bei gründlichstem Auswaschen nie, das aus tertiärem Natriumphosphat und Kalziumchlorid hergestellte Kalziumphosphat vollkommen chlorfrei zu erhalten. Diese Tatsache bildet eine Ergänzung zu den Erfahrungen, die Kleinmann beim Glühen von künstlicher und natürlicher Knochenasche mit Kalziumchlorid gemacht hatte. Er zeigte, daß eine Adsorption von Chlorionen auch bei künstlichen Knochenaschen, die zum größten Teil aus tertiärem Kalziumphosphat bestanden, eintrat und die daher nicht, wie G a s s m a n n annahm, als Beweis für eine besondere Apatitstruktur der Knochen gelten kann. --

Die Entfernung des Kalziums und des Phosphats aus der Modellösung entsprach der Übersättigung. Dabei wurde das Löslichkeitsprodukt des tertiären Kalziumphosphats in Tabelle II und III ($pLp\ Ca_3(PO_4)_2 = 26{,}56$) mit dem käuflichen Präparat nicht erreicht, während es mit dem selbsthergestellten Präparat unterschritten wurde (Tabelle IV). Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Präparate konnte nicht gegeben werden. Im Zusammenhang damit schien die Beobachtung zu stehen, daß das selbsthergestellte Kalziumphosphat den pH der Modellösung stets weiter herabdrückte als das Präparat von Fraenkel und Landau.

Daß bei geringen Bodenkörpermengen die Ausfällung des Kalziumphosphats selbst nach 20 stündigem Schütteln gegenüber der Ausfällung bei größeren Mengen Bodenkörper verzögert war, blieb wichtig für weitere Untersuchungen und stand im Einklang mit Untersuchungen von S e k e r a (16), der bei Fällung schwerlöslicher Stoffe aus ihrer übersättigten Lösung nur eine sehr träge Kristallkeimwirkung beobachtete. Außerdem stimmte der Wert: Ausgefälltes Kalzium zu ausgefälltem Phosphor nicht ganz mit dem theoretischen Wert des Verhältnisses im tertiären Kalziumphosphat überein[+]; er war allgemein etwas erhöht. Die Ursache wird einmal in der gleichzeitigen Ausfällung geringer Mengen Kalziumkarbonat zu suchen sein; außerdem können unvermeidbare Analysenfehler, die den Wert des aus kleinen Differenzen gebildeten Quotienten sehr stark beeinflussen, eine Abweichung des beobachteten Wertes vom

---

+) Den verschiedenen Kalziumphosphaten kommt folgender Wert für "Gesamt Ca/P" zu:

Sekundäres Kalziumphosphat, $CaHPO_4$	1,24,
Tertiäres Kalziumphosphat, $Ca_3(PO_4)_2$	1,94,
Apatit, $(Ca_3(PO_4)_2)_3 \cdot CaCO_3$	2,15,
Dahlit, $(Ca_3(PO_4)_2)_2 , CaCO_3$	2,26,
Quaternäres Phosphat, $4\ CaO.P_2O_5$	2,58,
Knochen, ca.	2,3 .

wirklichen zur Folge haben. Mit steigender Bodenkörpermenge wurde zudem die Ausfällung von einem anderen Vorgang überlagert, der schließlich bei größeren Mengen Bodenkörper zu einem Anwachsen des Phosphatgehaltes in der Lösung über den Anfangswert hinaus führte und der auch die Ursache für das Absinken des pH Wertes war. Dieser Vorgang, der für die Beurteilung der Serumversuche sehr wichtig war, wurde im folgenden eingehender untersucht.

Bei den bisherigen Versuchen wurde von allen Autoren die Wirkung des Bodenkörpers darin gesehen, daß dieser übersättigtes Serum animpft oder daß er eine gelöste Kalziumverbindung adsorbiert. Damit wurde angenommen, daß das feste Kalziumphosphat von sich aus nicht weiter auf das Serum wirkt. Meine Versuchsreihen mit Modellösungen hatten zunächst gezeigt, daß auch eine Adsorption von Kohlensäure an den Bodenkörper anzunehmen ist; außerdem ließ aber das Ansteigen des Phosphatgehaltes bei Versuchen mit größeren Mengen Kalziumphosphat als Bodenkörper auf Umsetzungen des festen Phosphats mit dem Lösungsmittel schließen. Lösungsversuche mit verschiedenen Mengen Kalziumphosphat in physiologischer Kochsalzlösung und in physiologischem Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4 bestätigten (Tabelle V), daß nie äquivalente Mengen Kalzium- und Phosphationen in Lösung gingen, sondern stets ein Überschuß an Phosphationen aus dem Bodenkörper herausgelöst wurde. Dieser Vorgang schritt beim Anwachsen der Bodenkörpermenge fort. Auch nach intensivem Zermahlen des festen Kalziumphosphats in einer Kugelmühle und nach Ausdehnung der Schütteldauer von 20 Stunden auf 8 Tage blieb die Abhängigkeit der gelösten Mengen sowie des Verhältnisses Ca/P der gelösten Ionen von der Bodenkörpermenge bestehen. Infolgedessen erklärt sich, daß bei den Modellversuchen Tabelle II-IV die Ausfällung des Kalziumphosphats von einem Ansteigen des Phosphatgehaltes überlagert wird, so daß der Quotient Ca/P der ausgefällten Mengen nicht dem theoretischen Wert des Verhältnisses im tertiären Kalziumphosphat entsprach, sondern größer war.

Keineswegs kann das Anwachsen des Phosphatgehaltes gegenüber dem Gehalt an Kalziumionen beim Lösen des tertiären Kalziumphosphats als Folge der Hydrolyse des Salzes aufgefaßt werden. Obwohl die in Lösung gegangenen PO_4'''-Ionen sich zu HPO_4'', H_2PO_4'-Ionen und freier Phosphorsäure umsetzen, könnten doch die gelösten Phosphationen nicht im Verhältnis zu den gelösten Kalziumionen ansteigen, solange nur ein Körper von der einheitlichen Zusammensetzung eines tertiären Kalziumphosphats existiert. Außerdem müßte das gelöste Kalziumphosphat unter dem Einfluß der Hydrolyse

alkalisch reagieren; die Lösungsversuche zeigten jedoch, daß die Lösung saurer wurde. Selbst der pH des Puffers wurde beim Einbringen von tertiärem Kalziumphosphat nach der sauren Seite verschoben. In Schüttelversuchen mit kalzium- und phosphathaltigem Substrat beweist daher die Abnahme des pH nicht, daß die Ausfällung eine Änderung des pH in diesem Sinne bewirkte.

Das Ergebnis der Lösungsversuche deutet darauf hin, daß tertiäres Kalziumphosphat das Bestreben hat, sich beim Zusammenbringen mit Wasser in ein basisches Phosphat umzusetzen, indem sich ein Überschuß an Phosphationen aus dem festen Phosphat herauslöst. Diese Erscheinung soll im folgenden als "Hydrolyse des B o d e n k ö r p e r s" bezeichnet werden.

Zunächst wurde untersucht, ob eine Verunreinigung des angewandten tertiären Kalziumphosphats mit saurem Kalziumphosphat diese Erscheinung einer Hydrolyse des Bodenkörpers vortäuschte. Tatsächlich zeigte die Analyse des tertiären Kalziumphosphats "Kahlbaum zur Analyse", welches ich zunächst bei meinen Versuchen verwendet hatte, daß es zu einem beträchtlichen Teil saures Kalziumphosphat enthielt. Jedoch ließen auch Lösungsversuche mit selbsthergestelltem Kalziumphosphat und mit dem in den Versuchsreihen Tabelle II, III und V verwendete Präparat "Fraenkel & Landau zur Analyse" - beide von richtiger Zusammensetzung - sowie einige Versuche von Hastings und Mitarbeiter ((vergl. (7), S.791, Versuch 4,7,10; die Erscheinung wurde dort nicht richtig gedeutet!) eine Hydrolyse des Bodenkörpers erkennen. Ein deutlich basisches Kalziumphosphat, welches ich durch langandauerndes Schütteln mit kohlensäurefreiem, öfters erneuertem Wasser gewann, zeigte ebenfalls - wenigstens beim Lösen in Veronal-Azetatpuffer - diese Anomalie (Tabelle VI). Ferner schüttelte ich tertiäres Kalziumphosphat mit öfters erneuerter physiologischer Kochsalzlösung und physiologischen Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4 und stellte durch Analyse fest, daß das Ca/P Verhältnis der jedesmal in Lösung gegangenen Mengen bei gleichen Mengen Bodenkörper stets kleiner als 1,94 und annähernd konstant war (Tabelle VII und VIII). Abb. II zeigt die Abhängigkeit des Ca/P Wertes von dem pH des Puffers bei gleichen Mengen Bodenkörper. Aus allen Untersuchungen ging hervor, daß das Inlösunggehen überwiegender Mengen Phosphationen nicht auf Beimengungen von sekundärem Kalziumphosphat im tertiären zurückzuführen war, sondern daß es durch Umsetzung des tertiären Kalziumphosphats zu basischem Phosphat erklärt werden mußte.

Umwandlungen der verschiedenen Kalziumphosphate ineinander sind in der Literatur öfters beschrieben worden. Das leichter

lösliche sekundäre Kalziumphosphat geht bei Gegenwart von Wasser in das schwerer lösliche tertiäre Kalziumphosphat über. Untersuchungen von W a r i n g t o n (17), R i n d e l l (18) und B u c h (19) haben ergeben, daß die Umsetzung nicht bei tertiärem Kalziumphosphat stehen bleibt, sondern daß sie - wenn auch verlangsamt - weiter zu basischem Kalziumphosphat fortschreitet.

Keines der basischen Kalziumphosphate ist bisher als einheitliche Substanz isoliert worden. Während ihnen verschiedentlich die Form eines Oxyapatits, $(Ca_3(PO_4)_2)_3 \cdot CaO$, zugeschrieben wurde, vermuteten C a m e r o n und B e l l (20), daß alle basischen Kalziumphosphate feste Lösungen des tertiären Kalziumphosphats mit Kalziumoxyd seien. Von K r a m e r (5) wurde sogar die Existenz eines einheitlichen chemischen Individuums von der Zusammensetzung des tertiären Kalziumphosphats abgelehnt; auch die von W e n d t und C l a r k (21) aufgestellte Titrationskurve der Phosphorsäure mit Kalziumhydroxyd läßt die Entstehung eines solchen nicht erkennen. Röntgenspektroskopisch erwiesen sich nach Untersuchungen von R o s e b e r r y , H a s t i n g s und M o r s e (22) tertiäres Kalziumphosphat, alle basischen Kalziumphosphate sowie die karbonathaltigen Apatite, Dahlite und Knochen als ähnliche Körper; sie unterschieden sich in ihren Röntgenspektren wesentlich von dem des sekundären Kalziumphosphats. - Die gleiche Zweiteilung der schwerlöslichen Kalziumphosphate macht sich auch in ihrer Löslichkeit - soweit sie untersucht worden ist - geltend. Tertiäres Kalziumphosphat und die Knochen besitzen nach H a s t i n g s die gleiche Löslichkeit, die sich aber von der des sekundären Kalziumphosphats unterscheidet (D o m o n t o v i t s c h und S a r u b i n a (23)).

In diesem Zusammenhang waren meine Lösungsversuche mit Knochenpulver in physiologischer Kochsalzlösung und physiologischem Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4 von Bedeutung. Da organische Bestandteile unveraschter Knochen zu Reaktionen hätten Anlaß geben können, die nicht auf einer Wirkung der Knochensalze selbst zu beruhen brauchten, wurden alle Versuche gleichzeitig auch mit nach G a b r i e l (24) feucht veraschtem Knochenpulver ausgeführt, bei dem wiederum nicht vorauszusehen war, in welcher Weise die Veraschung von einer Veränderung der chemischen Struktur begleitet war. Erst die tatsächlich beobachtete Übereinstimmung der Ergebnisse der Versuche mit veraschtem und unveraschtem, aber entfettetem Knochenpulver ließ einen eindeutigen Schluß zu. Tabelle IX mit dem Ergebnis der Lösungsversuche mit v e r a s c h t e m Knochenpulver zeigt, daß im Gegensatz zu den Versuchen mit tertiärem Kalziumphosphat im wesentlichen nur Kalzium

in Lösung ging; der Gehalt des Substrats an Phosphor gestattete nur den Nachweis, aber keine Analyse mehr. Der pH der physiologischen Kochsalzlösung und des Puffers wurde auf ca. 8 erhöht.

Bisher wurde angenommen, daß in den Knochen tertiäres Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat zu einem Komplex, einem Apatit $(Ca_3(PO_4)_2)_3.CaCO_3$ (H o p p e - S e y l e r (25), W e r n e r (26), G a s s m a n n (27)) oder einem Dahlit, $(Ca_3(PO_4)_2)_2.CaCO_3$, (R o s e b e r r y, H a s t i n g s und M o r s e (22)) vereint sind. Bei den Knochenanalysen war es daher üblich, den Wert Ca/P des in den Knochen enthaltenen Kalziumphosphat als "Rest Ca"/P anzugeben, wobei unter "Rest Ca" die Differenz aus "Gesamt Ca" und derjenigen Menge Kalzium zu verstehen war, die als Karbonat gebunden angenommen wurde. Da bei den oben genannten röntgenspektroskopischen Untersuchungen festgestellt worden war, daß kein Kalziumkarbonat in den Knochen enthalten ist, so liegt die Vermutung nahe, daß für das Kalziumphosphat der Knochen der Wert "Gesamt Ca/P" maßgeblich ist. Das Kalziumphosphat wäre daher weit basischer als ein tertiäres Kalziumphosphat. Diese Annahme wurde durch meine Lösungsversuche weitgehend gestützt, denn das Kalziumphosphat von Ca/P 2,04 verhielt sich beim Lösen anders als das angewandte Knochenpulver, dessen "Rest Ca/P" 2,0 betrug.

Im Ganzen stützen meine Untersuchungen über die Umwandlung von tertiärem Kalziumphosphat zu basischem die Auffassung, daß bei einem bestimmten pH ein Kalziumphosphat einer bestimmten Zusammensetzung mit dem Substrat im Gleichgewicht steht. Es kann angenommen werden, daß die Zusammensetzung des Bodenkörpers durch die Titrationskurve der Phosphorsäure mit Kalziumhydroxyd wiedergegeben wird, die allerdings in dem fraglichen Bereich nur extrapoliert bekannt ist. Eigene Versuche haben ergeben, daß beim Neutralpunkt sich ein Kalziumphosphat vom Ca/P 2,04 im Gleichgewicht mit der wässrigen Lösung befand. Denn selbst nach täglichem, etwa 4 stündigem Schütteln mit jedesmal erneuertem, kohlensäurefreiem Wasser konnte ich auch nach einem halben Jahre keine Veränderung in der Zusammensetzung des Kalziumphosphats wahrnehmen. Außerdem zeigten Lösungsversuche mit diesem Phosphat, daß nicht mehr die neutrale Kochsalzlösung, wohl aber der leicht alkalische Puffer eine weitere Umwandlung des Kalziumphosphats zu basischerem bedingte. Umgekehrt kann der Vorgang beim Lösen von Knochen damit erklärt werden, daß das stärker basische Kalziumphosphat an basischen Bestandteilen verliert, weil die physiologische Kochsalzlösung und der leicht alkalische Puffer gegenüber diesem Kalziumphosphat sauer wirken.- Auch bei der F ä l l u n g von Kalziumphosphaten müßte stets das dem pH des Substrats entsprechende

Kalziumphosphat entstehen - vorausgesetzt, daß die Ionenkonzentration nicht ausreicht, das Löslichkeitsprodukt des sekundären Kalziumphosphats zu überschreiten. Andernfalls bildet sich erst das sekundäre Phosphat, weil die Fällung des tertiären und basischen Phosphats nach H o l t und Mitarbeiter als Reaktion höherer Ordnung sehr langsam verläuft. Das sekundäre Kalziumphosphat setzt sich dann nach der Gleichung

$$3\ CaHPO_4 \rightleftharpoons Ca_3(PO_4)_2 + H_3PO_4\ ,$$

die keine Gleichgewichtsreaktion sein kann, sondern wahrscheinlich durch die verschiedene Löslichkeit der beiden Phosphate zustande kommt, zu tertiärem und weiter zu basischem Phosphat um.

II. V e r s u c h e m i t S e r u m u n d S e r u m - u l t r a f i l t r a t e n .

Nachdem die Vorgänge beim Ausfällen von Kalzium-, Phosphat- und Karbonationen aus übersättigten Lösungen mit bekannten Ionenverhältnissen untersucht worden waren, wurden in gleicher Versuchsanordnung Serumversuche angestellt.

Technische Schwierigkeiten bereitete dabei die quantitative Entfernung des Bodenkörpers. Selbst langandauerndes Zentrifugieren bei 3000 U.p.M. genügte oft nicht, um den Bodenkörper vollkommen aus dem Serum zu entfernen; viele Serumversuche wurden hierdurch wertlos. Diese Erscheinung trat vor allem dann auf, wenn das angewandte Serum nicht vollständig optisch leer war. Auch der Verteilungsgrad des Bodenkörpers spielte dabei eine gewisse Rolle. Knochenasche ließ sich nie ganz aus dem Serum entfernen. Obwohl es mir gelang, auf diese Weise erhebliche Mengen Knochenasche im Serum zu suspendieren, scheint diese Tatsache keine physiologische Bedeutung zu besitzen. Die Auffassung D h a r s (28), daß im Serum ein kolloidales Kalziumphosphat vorhanden sei und den Vorgang der Verkalkung bewirke, kann durch meine Beobachtung nicht gestützt werden, da sie dann im Widerspruch mit der ausfällenden Wirkung des festen Kalziumphosphats stände.

Wie Tabelle X, S. 35 zeigt, ähnelt das Resultat des Serumversuchs dem entsprechenden Modellversuch sehr. Der pH des Serums sank mit steigender Bodenkörpermenge. Im gleichen Sinne veränderte sich der Gehalt an Kalzium und an Kohlensäure im Serum. Die Abnahme des Kohlensäuregehaltes kann wie im Modellversuch mit Adsorption an den Bodenkörper erklärt werden, zumal I r v i n g (29) diese

Abnahme weitgehend unabhängig von der Kohlensäurespannung des Serums fand. Eine Serumversuchsreihe mit dem selbsthergestellten Kalziumphosphat zeigt (Tabelle XI, S.36) wiederum dessen erhöhtes Adsorptionsvermögen. Daß bei einer Versuchsreihe mit Serum und unveraschtem Knochenpulver (Tabelle XII,S.36; mit veraschtem Knochenpulver erhielt ich das gleiche Resultat.) viel Kohlensäure adsorbiert wurde, habe ich bereits erwähnt. Für diese Versuchsreihe war ferner das Ansteigen des Kalziumgehaltes bei 2 g Bodenkörper bemerkenswert; diese Erscheinung stand im Einklang mit der beim Lösen beobachteten Hydrolyse der Knochenerde, die im entgegengesetzten Sinne wie bei dem tertiären Kalziumphosphat verlief.

Wie im Modellversuch nahm auch bei dem Serumversuch auf Tabelle X der Gehalt des Serums an anorganischem Phosphor zunächst ab; bei 2 g Bodenkörper stieg die Konzentration wieder geringfügig an. Trotzdem war die Erscheinung der Hydrolyse des Bodenkörpers im Serum keineswegs zurückgedrängt, wie ein Versuch mit dialysiertem Pferdeserum bewies (Tabelle XIII,S.37).Allerdings war der pH des dialysierten Serums vor dem Versuch stark erniedrigt(6,35) und das Verhältnis Ca/P der in Lösung gegangenen Ionen daher größer als im Puffer vom pH 7,4; ein Vergleich mit der Kurve (Abb. II), die die Abhängigkeit des Quotienten Ca/P der gelösten Mengen vom pH des anorganischen Substrates wiedergibt, zeigt aber annähernde Übereinstimmung der Quotienten bei pH 6,35. Die Beobachtung, daß im Serumversuch bei 2000 mg Bodenkörper der Gehalt an anorganischem Phosphor nicht in dem Maße zunahm wie im Modellversuch, kann darauf zurückgeführt werden, daß aus dem Serum größere Mengen Kalzium entfernt werden. Nicht nur der ultrafiltrable Anteil mußte ausgefällt worden sein, sondern - vielleicht nach vorangegangener Dissoziation - auch ein Teil des eiweißgebundenen Serumkalziums.

Mit der Beobachtung, daß nur bei kleineren Mengen Bodenkörper eine Abnahme des Gehaltes an anorganischem Phosphor im Serum eintrat, während bei größeren Mengen Bodenkörper der Phosphorgehalt wieder anstieg, ist nun eine Erklärung gefunden, warum andere Autoren eine Abnahme des Phosphorgehaltes überhaupt nicht wahrnahmen (vergl.S.8,Tabelle I) und daraufhin eine Übersättigung des Serums an Kalziumphosphat ablehnten. Wie stark ferner die Hydrolyse des Bodenkörpers als eine Reaktion an Phasengrenzflächen von der jeweiligen Beschaffenheit des angewandten tertiären Kalziumphosphats abhängt, zeigt die Versuchsreihe von Tabelle XI mit selbsthergestelltem Kalziumphosphat, bei der ein Ansteigen des Phosphorgehaltes bereits bei 200 mg Bodenkörper wahrzunehmen war.

Die stärkere Verzögerung der Ausfällung in den Serumversuchen mit kleineren Bodenkörpermengen gegenüber den entsprechenden Modellversuchen kann meines Erachtens nur auf den Proteingehalt des Serums und nicht auf Adsorption einer Kalziumkomplexverbindung zurückgeführt werden. Tabelle XIV, die das Resultat einer Versuchsreihe wiedergibt, bei der nebeneinander Serum, Serumultrafiltrat und Modellösung mit verschiedenen Mengen Kalziumphosphat geschüttelt wurden, zeigt, daß im Serumultrafiltrat viel schneller eine Ausfällung erfolgte als im Serum. Auch P a u l i und S a m e c (30) haben bereits auf die im Serum verzögerte Ausfällung hingewiesen.

Ein Unterschied zwischen dem Resultat des Modellversuchs und des Serumversuchs bestand ferner darin, daß das Verhältnis Ca/P der ausgefällten Mengen bei kleinen Mengen Bodenkörper in den Serumversuchen etwas größer war als bei den Modellversuchen. Nur bei einer hier nicht wiedergegebenen Versuchsreihe mit einem Serum von auffallend niedrigem Gehalt an anorganischem Phosphor beobachtete ich einen merklich erhöhten Wert für den Quotienten Ca/P; da für einen solchen Fall kein entsprechender Modellversuch vorlag und eine Erklärung mit dem die Ausfällung überlagernden Vorgange durchaus möglich war, mag diese Beobachtung keine weitere Bedeutung haben. Im allgemeinen blieb der Unterschied zwischen dem Wert Ca/P der ausgefällten Mengen im Serum und in den Modellösungen sehr gering und hätte auf einen Beobachtungsfehler zurückgeführt werden können, wenn er nicht übereinstimmend bei mehreren Versuchsreihen gefunden wurde und daher als tatsächlich vorhanden angesehen werden mußte.

Die Beurteilung dieses Befundes ist außerordentlich schwierig, denn es läßt sich schwer absehen, inwieweit dieser im Serum etwas erhöhte Ca/P Wert durch die Hydrolyse des Bodenkörpers, die in beiden Versuchsreihen etwas verschieden sein kann und sich quantitativ nicht erfassen läßt, bedingt war. Es wäre aber auch wahrscheinlich, daß im Serum nur das Löslichkeitsprodukt des tertiären Kalziumphosphats und nicht dasjenige des sekundären Kalziumphosphats überschritten ist. Es fiele dann sofort ein Kalziumphosphat entsprechender Basizität aus, während im anorganischen Substrat die Fällung über das sekundäre Kalziumphosphat verläuft. (Vergl. S.21). Durch Untersuchungen von K r a m e r (5) an frisch verkalkten Geweben sowie durch Röntgenuntersuchungen von R o s e b e r r y, H a s t i n g s und M o r s e (22) war bereits erwiesen, daß die Verkalkung nicht über das sekundäre Kalziumphosphat verläuft.

Die Vermutung, daß das Serum nicht an sekundärem Kalziumphos-

phat übersättigt sei, wird durch die Beobachtung K l e i n m a n n s, daß mit sekundärem Kalziumphosphat als Bodenkörper Kalzium und anorganischer Phosphor aus dem Serum nicht entfernt werden können, gestützt. Die Unwirksamkeit des Kalziumkarbonats als Bodenkörper weist ebenfalls darauf hin, daß nicht das gesamte ultrafiltrable Kalzium als Kalzium i o n e n vorliegen kann, sondern im Höchstfalle nur 2,3 mg%. Von verschiedenen Seiten ist die Menge des ionisierten Kalziums im Serum zu 2 mg% bestimmt worden (B r i n k m a n und v a n D a m (31), F r e u d e n b e r g und B u d d e (32), H a f f n e r und S i m o n (33), C o r t e n und E s t e r m a n (34),). Wenn auch die Gültigkeit dieser auf elektrometrischen und chemischen Methoden beruhenden Messungen heute stark angezweifelt wird, so stimmt doch der Wert mit meinen Versuchsergebnissen überein und ergäbe eine Übersättigung an tertiärem Kalziumphosphat. Es bliebe dann allerdings die Frage offen, in welcher Form die restlichen ca.4mg% ultrafiltrablen Kalzium im Serum enthalten sind. Die Tatsache, daß mehr Kalzium bei meinen Versuchen ausgefällt wurde, als ionisiert im Serum angenommen werden können, führt zu der Vermutung, daß die 4 mg% Kalzium als "potentielle" Ionen vorhanden sind, die beim Verbrauch der Kalziumionen sofort in den ionisierten Zustand übergehen. Das Vorhandensein potentieller Ionen wäre gut durch eine von K l i n k e im Serum vermutete gering dissoziierte Kalziumkomplexverbindung zu erklären; doch ist deren Existenz noch in keiner Weise bewiesen. Insbesondere ist die Annahme ihrer Existenz zur Erklärung des Verkalkungsvorganges - entgegen der Ansicht K l i n k e s - nicht notwendig. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß der Vorgang der Verkalkung entsprechend der Ausfällung von Kalzium, Phosphor und Kohlensäure mit festem Kalziumphosphat aus Serum verlaufend gedacht werden kann. Diese Ausfällung weist nicht auf das Bestehen eines Kalziumkomplexes im Sinne K l i n k e s hin, sondern rechtfertigt die Annahme einer Übersättigung des Serums an tertiärem Kalziumphosphat.

Das Ansteigen des pH in den Geweben, welches zu einem weiteren Überschreiten des Löslichkeitsproduktes von tertiärem Kalziumphosphat führen sollte, wurde von H o f m e i s t e r (2) als Ursache für die Aufhebung der Übersättigung und den Eintritt der Verkalkung angesehen. Auch meine Versuche könnten diese Annahme stützen, da das stark basische Kalziumphosphat der Knochen auf eine Fällung bei erhöhtem pH hinweist. Ferner ließe sich aus meinen Lösungsversuchen mit Knochenpulver auf ein erhöhtes pH in unmittelbarer Umgebung der Knochen schließen und damit die von K r a m e r (5) erzielte Modellverkalkung an Knochen, die in

normales Serum eingelegt wurden, erklären. Wie allerdings in vivo ein Ansteigen des pH zustande käme, bedürfte weiterer Untersuchungen; die Abnahme der Kohlensäurespannung in den Geweben, wie von H o f m e i s t e r angenommen wurde, mag hierzu kaum ausreichen. Außerdem wurde gerade in Geweben erhöhter Stoffwechseltätigkeit keine Verkalkung wahrgenommen.

C. E x p e r i m e n t e l l e r T e i l.

I. U n t e r s u c h u n g s m e t h o d e n.

a) B e h a n d l u n g.

Das Schütteln des Serum und der Modellösungen erfolgte im Wasserbad bei 38 Grad. Alle Versuche mit bikarbonathaltigem Substrat wurden unter Paraffin ausgeführt. Um eine Berührung der Lösung mit der Luft zu vermeiden, wurden zum Schütteln Kölbchen von 35 ccm Fassungsvermögen und engen, etwa 15 cm langen Hälsen benutzt, die fast bis zum oberen Rande mit Paraffin aufgefüllt wurden. Einen besonderen Kapillarverschluß, wie ihn K l i n k e anwendete, war bei dieser Form der Schüttelgefässe überflüssig, weil die Lösung beim Schütteln der Gefässe in aufrechter Lage nicht in den langen Hals der Kölbchen eindringen konnte. Die Gefässe wurden beim Schütteln unter Paraffin nur mit Zellstoff, sonst mit Gummistopfen verschlossen. Da bei derartig vollgefüllten Gefässen ein Aufwirbeln des Niederschlags Schwierigkeiten bereitete, wurde zu jedem Gefäß 2-3 Glasperlen hinzugegeben. - Die Serumversuche wurden alle steril ausgeführt.

b) S u b s t r a t e.

S e r u m : Bei den Serumversuchen wurde normales, steriles Pferdeserum verwendet. Um die autolytisch wirkenden Fermente zu inaktivieren und jede Zersetzung der organischen Phosphorverbindungen im Serum zu vermeiden, wurde ein Teil der Versuche mit Serum angestellt, welches 3 Stunden auf 57 Grad erhitzt worden war. Später konnte von dieser Vorsichtsmaßregel abgesehen werden, da das inaktivierte Serum bei den Versuchen sich nicht anders verhielt als das aktive Serum.

Als dialysiertes Pferdeserum kam ein von den Behring-Werken für Injektionszwecke hergestelltes Serum zur Verwendung.

S e r u m u l t r a f i l t r a t e: Zur Gewinnung des Serumultrafiltrats wurde die von G r e e n b e r g und G u n t h e r (10) herrührende Mikro-Ultrafiltrationsmethode etwas umgestaltet, da für die Schüttelversuche größere Mengen Ultrafiltrat gebraucht wurden. Die Herstellung der Kollodiumfilter erfolgte nach einer Methode von T r e n d e l e n b u r g (35; vergl. auch R o n a, 36). Folgende Ausführung der T r e n d e l e n b u r g´schen Methode ergab gute Ultrafiltrate, bei denen die Sulfosalizylprobe auf Eiweiß negativ ausfiel: Ca. 35 ccm lange und 18 mm weite Reagenzgläser, die auf dem Boden ein Loch von 1-2 mm Durchmesser hatten, wurden in eine etwa 8%ige Gelatinelösung 2-3mal ca. 18 cm tief eingetaucht, bis die Öffnung verschlossen war. Die Reagenzgläser wurden dann in vertikaler Lage an einem Stativ befestigt, über Nacht getrocknet und am nächsten Tage in eine 4 %ige alkoholätherische Kollodiumlösung+) eingetaucht, zu der pro 100 ccm Lösung 3 ccm Äthylenglykol zugesetzt worden war (G r e e n b e r g-sche Vorschrift, etwas modifiziert). Nach dem Herausnehmen aus der Kollodiumlösung wurden die Reagenzgläser zunächst in vertikaler Lage solange gedreht, bis die überflüssige Kollodiumlösung abgetropft war. Dann wurden sie bis zum Verschwinden des Äthergeruchs in horizontaler Lage gedreht, von neuem in die Kollodiumlösung eingetaucht und die Behandlung wiederholt. Filter, die 6 mal eingetaucht worden waren, erwiesen sich als völlig eiweißdicht. Die Reagenzgläser wurden kurze Zeit in kaltem Wasser gewässert und die Kollodiumhülsen dann mit heißem Wasser abgelöst.- Für die Güte der Filter war die Temperatur, bei der sie hergestellt wurde, von Bedeutung. Die Angabe von G r e e n b e r g, daß bei Raumtemperaturen über 21 Grad die Herstellung von Filtern unmöglich ist, wurde bestätigt.

Die Ultrafilter wurden mit Seidenfaden an dem Einsatzstück des abgebildeten Ultrafiltrationsgerätes (Abb.I) befestigt; zweckmäßigerweise wurden die Ränder der Filter mit Kollodium verklebt. Diese Einsatzstücke ermöglichten ohne große Mühe das Erneuern der Filterflüssigkeit. -- Die Ultrafiltration wurde bei einem Unterdruck von 170 mm Hg ausgeführt, der nach Angabe von G r e e n b e r g mit einer Wasserstrahlpumpe und einem Quecksilberventil hergestellt wurde. Um Kohlensäureverlust im Ultrafiltrat zu vermeiden, wurde vor das Ultrafiltrationsgefäß eine Flasche mit 0,2 molarem Phosphatpuffer vom pH 7,4, der in 100 ccm 0,1 g Natriumbikarbonat enthielt, geschaltet (Vorschrift von G r e e n b e r g).

+) Kollodiumlösung "Kahlbaum" "zur Herstellung von Membranen".

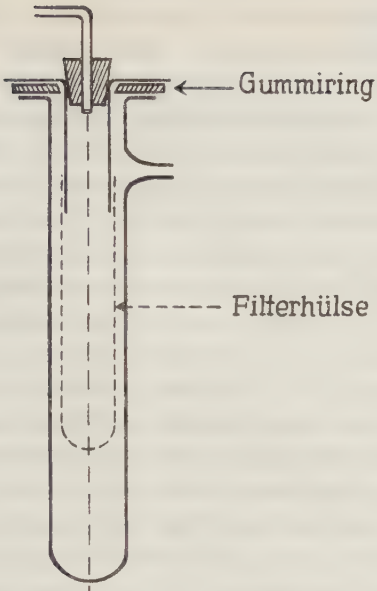


Abb. I, ½ nat. Grösse.
Ultrafiltrationsgefäss.

M o d e l l ö s u n g e n: Die Modellösungen wurden mit Hilfe von Kochsalz der ionalen Konzentration μ = 0,160 des Serum angepaßt.+) Modellösung I enthielt ferner ca. 6 mg % Kalzium als Kalziumchlorid, 168 mg % Natriumbikarbonat und ca 3 mg% Phosphor als Phosphatpuffer, dessen pH so gewählt wurde, daß nach Zugabe des Bikarbonats die Modellösung einen pH von etwa 7,5 erhielt. Modellösung II bestand aus physiologischem Veronal-Azetatpuffer (M i c h a e l i s (37),) vom pH 7,4, dem 6 mg % Kalzium als Kalziumchlorid sowie 3 mg % Phosphor als Phosphatpuffer vom pH 7,5 zugesetzt worden war. Der Kochsalzzusatz des Veronal-Azetatpuffers wurde dementsprechend vermindert.- Außerdem wurden kohlensäurefreie physiologische Kochsalzlösung sowie physiologische Veronal-Azetatpuffer verschiedener pH verwendet.

c) B o d e n k ö r p e r.

Außer dem tertiären Kalziumphosphat, Präparat Fraenkel und

+) Ob der Proteingehalt des Serums eine höhere ionale Konzentration (H a s t i n g s: 0,240) bedingt, ist noch ungewiß. Deshalb wurde hier wie üblich die ionale Konzentration des Serum mit 0,160 angenommen und diese Konzentration für die Modellösungen beibehalten.

Landau "zur Analyse" kamen selbsthergestelltes tertiäres Kalziumphosphat sowie veraschtes und unveraschtes, entfettetes Knochenpulver zur Verwendung.

T e r t i ä r e s K a l z i u m p h o s p h a t: Eine siedende Lösung tertiären Natriumphosphats, hergestellt aus äquivalenten Mengen Natronlauge und Phosphorsäure, wurde schnell zu einer siedenden Lösung von Kalziumchlorid gegossen, die etwa 10% mehr Kalzium als die berechnete Menge enthielt. Das Gemisch wurde noch 5 Minuten gekocht, der Niederschlag abzentrifugiert, bis zum Verschwinden der Chloridreaktion des Waschwassers heiß ausgewaschen, abgesaugt und über Nacht im Trockenschrank bei 100 Grad getrocknet. (Analyse: Ca/P 1,99).

K n o c h e n p u l v e r: Frische menschliche Knochen (femur) wurden von Mark und anhaftendem Gewebe befreit, in Streifen gesägt, 24 Stunden in fließendem Wasser gewässert, zerkleinert, im Trockenschrank bei möglichst tiefer Temperatur getrocknet, und in einer Knochenmühle zermahlen. Ein Teil wurde zur feuchten Veraschung nach G a b r i e l (24) verwendet. (Analyse: Ca 37,0 %, P 15,7%, CO_2 5,64%, Gesamt Ca/P 2,35.). Ein anderer Teil wurde im Soxhletapparat je einen Tag über Alkohol und über Äther extrahiert und dann im Achatmörser zermahlen (Analyse:Ca 23,6%,P 10,2%, Gesamt Ca/P 2,32).

d) A n a l y s e n .

Durch langandauerndes Zentrifugieren bei 3000 U.p.M. wurde das Substrat vom Bodenkörper abgetrennt und zu pH-,Kalzium-, Phosphor- und Kohlensäurebestimmungen verwendet.Soweit notwendig war, wurde die Aufarbeitung bikarbonathaltiger Substrate unter Paraffin ausgeführt.

Die p H - B e s t i m m u n g e n erfolgten bei Zimmertemperatur im Serum (unter Verdünnung mit kohlensäurefreier, physiologischer Kochsalzlösung) und in kohlensäurefreien Lösungen in der U-Elektrode mit stehender Wasserstoffblase, sonst kolorimetrisch unter Paraffin nach einer Methode von C u l l e n (38) bei Modellösungen mit Bikarbonatgehalt.

Zu den K a l z i u m b e s t i m m u n g e n i m S e r u m wurde das Kalzium nach der Methode von d e W a a r d als Kalziumoxalat gefällt und mit Permanganat titriert. In Modellösungen bereitete die Kalziumbestimmung nach dieser Methode Schwierigkeiten, da sich an der Oberfläche Häutchen von Kalziumoxalatkristallen bildeten, die beim Zentrifugieren an der Oberfläche blieben und beim Entfernen der Flüssigkeit mit weggespült wurden. Nach

einer Vorschrift von G r e e n b e r g, der bei Kalziumbestimmungen in Serumultrafiltraten dieselbe Wahrnehmung machte, wurde kalziumfreies Serum hinzugefügt, welches die Häutchenbildung verhinderte (im Serum war eine Häutchenbildung nie aufgetreten). Von einem Waschen des Kalziumoxalatniederschlags mit Ammoniakwasser, das mit Kalziumoxalat gesättigt war (Vorschrift von S t a n f o r d und W h e a t l e y (40)) wurde jedoch abgesehen, weil die Kalziumwerte dann stets zu hoch und außerdem recht ungleichmäßig ausfielen. Die Kalziumoxalatfällung wurde in M o d e l l l ö s u n g e n folgendermaßen aufgeführt: Die erforderliche Substratmenge (0,030 - 0,200 mg Ca) wurde in einem spitzen Zentrifugenglas auf 5 ccm aufgefüllt und mit 0,5 ccm eines kalziumfreien Serums (Darstellung: 2 Teile Serum, 2 Teile Wasser und 1 Teil 4%ige Ammoniumoxalatlösung 24 Stunden stehen lassen, dann abzentrifugieren) sowie 1 ccm 4%ige Ammoniumoxalatlösung hinzugefügt. Über Nacht blieb der Niederschlag zur Vervollständigung der Ausfällung stehen. Am nächsten Tage wurde zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit durch Umkippen entfernt, der Niederschlag in der üblichen Weise gewaschen und mit 1/100 n Permanganat titriert. Die Fehlergrenze betrug wie bei der Methode von d e W a a r d $\pm$ 0,005 mg Ca.

Die K o h l e n s ä u r e b e s t i m m u n g e n erfolgten in Serum und Modellösungen manometrisch nach v a n S l y k e (41). Der P h o s p h o r wurde kolorimetrisch mit Molybdänsäure und 1,2,4-Aminonaphtolsulfosäure nach der Methode von F i s k e und S u b b a r o w (42) in der von L o h m a n n und J e n d r a s s i k (43) abgeänderten Form bestimmt. Bei Bestimmungen in Serum wurde das Serum vorher mit Trichloressigsäure enteiweißt. Trübungen nach Zugabe von Molybdänsäure, wie sie schon von B e l l und D o i s y (44), F i s k e und S u b b a r o w (42) und K r a m e r (5) beschrieben wurden, ließen sich regelmäßig bei Versuchsreihen mit entfetteten Knochenpulver als Bodenkörper beobachten. Schlechte Enteiweißung, wie bisher von allen Autoren angenommen wurde, konnte nicht die Ursache solcher Trübungen sein, da auch anorganische Substrate, in denen nach dem Schütteln mit Pulver aus entfetteten Knochen weder mit Trichloressigsäure noch mit Sulfosalizylsäure Eiweiß nachgewiesen werden konnte, sich nach Zugabe der Molybdänsäure trübten. Es konnte festgestellt werden, daß der Niederschlag in irgendeiner Form Molybdänsäure und Phosphorsäure gebunden enthielt. Im anorganischen Substrat wurde sogar der gesamte Phosphor der Lösung sowie noch zur Kontrolle zugegebene 0,1 mg $P_2 O_5$ ausgefällt. Es konnten daher nur dann Werte von der Phosphorbestimmung angegeben werden, wenn keine

Trübungen nach Zugabe von Molybdänsäure auftraten.- Die Fehler der Methode hingen fast ausschließlich von dem Konzentrationsunterschied zwischen der Lösung unbekannten Gehalts und der Vergleichslösung ab; bei einem Konzentrationsunterschied bis zu 40 % bei 0,150 - 0,400 mg P_2O_5 +) betrug der Fehler ±3%, bei 0,050 - 0,150 mg P_2O_5 ± 6 %. Da nur ein Makrokolorimeter zur Verfügung stand, mußten immer ziemlich farbschwache Lösungen kolorimetriert werden, so daß bei meinen Angaben mit der maximalen Fehlergrenze zu rechnen ist.

II. Ergebnisse.

Alle Modell- und Serumversuchsreihen wurden mehrfach und mit tertiären Kalziumphosphaten verschiedener Herkunft ausgeführt. Im allgemeinen werden nur Versuchsreihen mit dem Präparat Fraenkel und Landau "zur Analyse" (Ca/P 1,96) wiedergegeben und nur einige Versuchsreihen -insofern charakteristische Unterschiede im Ergebnis beobachtet worden waren- mit einem selbsthergestellten Präparat (Ca/P 1,99).

Bis auf die in Tabelle XIII und XIV angeführten Versuchsreihen wurden alle Versuche mit 5,20,200 und 2000 mg Bodenkörper und 30 bezw. 25 ccm Substrat unternommen.

a) Versuche mit Modellösungen.

Tabelle II zeigt die Fällung aus bikarbonathaltiger Modellösung (Modellösung I) in Abhängigkeit von verschiedenen Mengen tertiären Kalziumphosphat (Präparat Fraenkel & Landau) als Bodenkörper. Spalte 7 enthält den Quotienten Ca/P der ausgefällten Mengen.Bei Versuch 7 konnte der Wert Ca/P nicht angegeben werden, da wegen der Hydrolyse des Bodenkörpers der Phosphatgehalt des Substrats über den Anfangsgehalt anstieg.Spalte 8 und 9 enthalten den negativen Exponenten der Ionenprodukte $Ca.CO_3$ und $Ca^3.(PO_4)^2$; sie sind mit pIp $CaCO_3$ und pIp $Ca_3(PO_4)_2$ bezeichnet. Ihre Berechnung erfolgte nach Hastings, jedoch mit dem Unterschied, daß die molare Ionenkonzentration pro Liter und nicht pro kg H_2O der Berechnung zugrunde lagen.- Der Versuch 0 ohne Bodenkörper gibt hier wie auch in allen anderen Versuchen die Anfangskonzentration der Modellösung an.

+) P_2O_5 Gehalt in 25 ccm Kolorimeterflüssigkeit.

Tabelle II.

Wirkung von festem tertiären Kalziumphosphat (Präparat Fraenkel & Landau) auf den Gehalt von Modellösung I.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	pH	Ca mg%	P mg%	CO_2 mmol	Ca/P ausgefällt	pIp $CaCO_3$	pIp $Ca_3(PO_4)_2$
0	--	7,62	5,6	3,4	19,1	--	6,76	22,88
1	5	7,58	2,7	2,1	19,0	2,2	7,12	24,35
2	5	7,60	2,9	2,1	--	2,1	--	24,21
3	20	7,59	2,3	1,9	18,3	2,2	7,20	24,55
4	20	7,58	2,4	1,9	18,2	2,1	7,19	24,65
5	200	7,60	1,7	1,8	17,7	2,4	7,33	25,04
6	200	7,57	1,9	1,8	17,8	2,3	7,33	24,96
7	2000	7,42	1,2	3,9	17,3	--	7,68	25,22

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.
Substratmenge: 30 ccm.
Ausführung unter Paraffin.

Tabelle III gibt das Resultat einer Versuchsreihe mit bikarbonatfreier Modellösung (Modellösung II) wieder.Bei Versuch 1 und 2 mit 5 mg Bodenkörper wurde kaum eine Ausfällung erzielt und daher der Wert für Ca/P der ausgefällten Mengen nicht angegeben.- Diese Versuchsreihe brachte den Beweis, daß die Zunahme des Phosphatgehaltes bei den Versuchen mit 2000 mg Bodenkörper unabhängig vom Bikarbonatgehalt der Modellösung erfolgt.

Tabelle III.

Wirkung von festem tertiären Kalziumphosphat (Präparat Fraenkel & Landau) auf den Gehalt von Modellösung II (bikarbonatfrei).

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	pH	Ca mg%	P mg%	Ca/P ausgefällt	pIp $Ca_3(PO_4)_2$
0	--	7,49	5,6	3,4	--	23,06
1	5	7,48	5,3	3,2	--	23,33
2	5	7,47	5,4	3,3	--	23,30
3	20	7,46	3,1	2,0	1,8	25,48
4	20	7,47	3,0	1,9	1,9	25,57
5	200	7,41	1,8	1,6	2,1	25,50
6	200	7,40	1,9	1,5	2,0	25,50
7	2000	7,39	1,4	4,2	--	25,24
8	2000	7,29	1,4	4,4	--	25,22

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.
Substratmenge: 30 ccm.

Tabelle IV zeigt das Resultat eines Parallelversuchs zu Tabel-

le II und wurde mit dem selbsthergestellten Kalziumphosphat angestellt. Die vom Bodenkörper adsorbierte Menge CO_2 betrug hier maximal 4,3 mmol gegenüber 1,8 in Tabelle II. Die Hydrolyse des Bodenkörpers trat bei diesem Präparat stärker hervor; zwischen beiden Erscheinungen bestand aber kein Zusammenhang, wie ein mit dem gleichen Präparat ausgeführter, hier nicht wiedergegebener Versuch in bikarbonatfreier Modellösung bewies.

Tabelle IV.

Wirkung von festem tertiärem Kalziumphosphat (selbsthergestelltes Präparat (Ca/P 1,99) auf den Gehalt von Modellösung I.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	pH	Ca mg%	P mg%	CO_2 mmol	Ca/P ausgef.	pIp $CaCO_3$	pIp $Ca_3(PO_2)_3$
0	--	7,82	4,7	3,1	19,0	--	6,66	22,76
1	200	7,18	0,9	2,5	18,1	6,3	8,04	28,68
2	2000	6,75	0,4	3,6	14,7	--	9,04	28,57

Substratmenge: 30 ccm.
Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.
Ausführung unter Paraffin.

Tabelle V zeigt Lösungsversuche mit tertiärem Kalziumphosphat (Präparat Fraenkel & Landau) mit physiologischer Kochsalzlösung und Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4. Bei den Versuchen mit physiologischer Kochsalzlösung wurde der pH nur auf eine Dezimale genau angegeben, da die pH-Bestimmung im ungepufferten Substrat nach den üblichen Methoden nicht mit der Genauigkeit erfolgen kann wie im gepufferten Substrat. - Diese Versuchsreihe ergab die Abhängigkeit der in Lösung gegangenen Mengen sowie ihres Ca/P Quotienten von der Bodenkörpermenge.

Tabelle V.

Lösungsversuche mit tertiärem Kalziumphosphat (Präparat Fraenkel & Landau) in physiologischer Kochsalzlösung und Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	Substrat	pH	In Lösung gegangen: Ca mg%	P mg%	Ca/P
1	20	30 ccm	6,9	1,0	0,6	1,8
2	200	physiol.	6,9	1,3	1,0	1,3
3	2000	Kochsalzlös.	6,3	1,9	6,3	0,3
4	20	30 ccm	7,36	1,3	0,9	1,4
5	200	Veronal-Aze-	7,34	1,5	1,0	1,5
6	2000	tatpuffer.	7,20	1,1	4,4	0,3

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.

Zu den Lösungsversuchen Tabelle VI wurde das selbsthergestellte tertiäre Kalziumphosphat, Ca/P 1,99, mit mehrmals erneuertem kohlensäurefreien Wasser 48 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt, abfiltriert, über Nacht im Trockenschrank bei 100 Grad getrocknet und nach Analyse (Ca/P 2,04) als Bodenkörper verwendet. Während das Schütteln mit dem leicht alkalischen Puffer weitere Umsetzung des Bodenkörpers herbeiführte, erwies sich die Umsetzung mit der neutralen Kochsalzlösung als beendet. - Tägliches Schütteln mit stets erneuertem kohlensäurefreien Wasser bei Zimmertemperatur führte auch nach einem halben Jahre zu keiner Veränderung in der Zusammensetzung des Kalziumphosphats (Analyse: Ca/P 2,02).

T a b e l l e VI.

Lösungsversuche mit tertiärem Kalziumphosphat, selbsthergestelltes Präparat, Ca/P 2,04, in physiologischer Kochsalzlösung und Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	Substrat	pH	In Lösung gegangen: Ca mg%	P mg%	Ca/P
1	20	30 ccm	6,6	0,8	0,4	2,0
2	200	physiol.	5,7	1,7	1,1	1,5
3	2000	Kochsalzlös.	5,7	5,6	2,2	2,5
4	20	30 ccm	7,22	0,9	0,5	1,8
5	200	Veronal-Aze-	7,19	0,9	0,9	1,0
6	2000	tatpuffer.	6,96	1,1	1,5	0,7

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.

Tabelle VII und VIII gibt das Resultat zweier Versuchsreihen wieder, bei denen je 2 g tertiäres Kalziumphosphat (selbsthergestelltes Präparat) mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung

T a b e l l e VII.

Lösungsversuch mit tertiärem Kalziumphosphat, selbsthergestelltes Präparat, Ca/P 1,99, in öfters erneuerter physiologischer Kochsalzlösung.

Nr.	Schüttel-dauer in Std.	pH	In Lösung gegangen Ca mg%	P mg%	Ca/P	pIp $Ca_3(PO_4)_2$
1	20	6,0	4,4	3,7	1,2	27,63
2	24	6,1	3,3	2,6	1,3	28,01
3	20	6,1	3,1	2,0	(1,6)	28,37
4	20	6,1	1,8	1,7	1,1	28,85
5	20	6,2	1,3	1,5	0,9	29,33
6	20	6,4	1,2	1,2	1,1	29,23

Schütteltemperatur: 38 Grad.
Bodenkörpermenge: 2 g.
Substratmenge: 30 ccm.

bezw. Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4 geschüttelt wurden; nach kurzem Stehen wurde das Substrat vom Bodenkörper abgegossen, analysiert, durch frisches ersetzt und erneut geschüttelt. Die in den Tabellen unter "Nr." angeführten Zahlen geben an, zum wievielten Male frische Kochsalzlösung bezw. Puffer zu dem Bodenkörper hinzugesetzt wurde. -Die beiden Versuchsreihen zeigen, daß das Verhältnis Ca/P der in Lösung gegangenen Ionen annähernd konstant war, obwohl die in gleichen Zeiträumen gelösten Mengen immer geringer wurden.

T a b e l l e VIII.

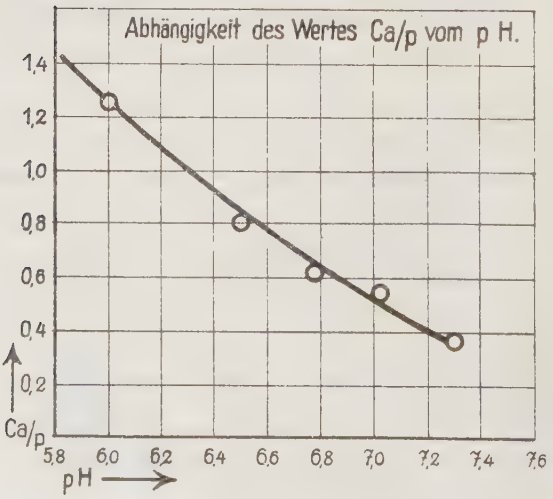
Lösungsversuch mit tertiärem Kalziumphosphat, selbsthergestelltes Präparat, Ca/P 1,99, ein öfters erneuertem Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4.

Nr.	Schütteldauer in Std.	pH	In Lösung gegangen: Ca mg%	P mg%	Ca/P	pIp $Ca_3(PO_4)_2$
1	20	6,96	0,4	2,9	0,14	28,04
2	24	7,22	0,2	2,0	0,1	28,60
3	20	7,32	0,17	1,4	0,12	28,89
4	20	7,27	0,18	1,15	0,16	29,07
5	20	7,34	0,16	0,96	0,17	29,25
6	20	7,34	0,10	0,95	0,1	30,00

Schütteltemperatur: 38 Grad.
Bodenkörpermenge: 2 g.
Substratmenge: 30 ccm.

Abb. II gibt die Abhängigkeit des Quotienten Ca/P der in Lösung gegangenen Ionen vom pH des Puffers bei 2g Bodenkörper (Präparat Fraenkel & Landau) und 30 ccm Substrat wieder. Wie in allen Versuchsreihen betrug die Schütteldauer 20 Stunden und die Versuchstemperatur 38 Grad. Als Abszisse wurde der pH des Substrats n a c h dem Versuch abgetragen. Es traten während des Versuchs stets Verschiebungen

Abb. II.



des pH in Richtung zu pH 6 hin auf.

Tabelle IX gibt einen Lösungsversuch mit veraschtem Knochenpulver wieder. Da die in Lösung gegangenen Phosphatmengen nicht zur quantitativen Bestimmung ausreichten, konnte das Verhältnis Ca/P der in Lösung gegangenen Ionen nicht angegeben werden.

Tabelle IX.

Lösungsversuche mit veraschtem Knochenpulver in physiologischer Kochsalzlösung und in Veronal-Azetatpuffer vom pH 7,4.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	Substrat	pH	In Lösung gegangen: Ca mg%	P mg%
1	20	30 ccm	6,0	0,7	< 0,2
2	200	physiol.	6,7	1,4	~ 0,2
3	2000	Kochsalzlös.	8,0	3,2	> 0,2
4	20	30 ccm	7,69	1,1	~ 0,2
5	200	Veronal-Aze-	7,75	2,6	~ 0,2
6	2000	tatpuffer.	7,92	4,0	> 0,2

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.

b) Versuche mit Serum und Serumultrafiltrat.

Tabelle X zeigt das Ergebnis der Fällung von Kalzium, anorganischem Phosphor und von Kohlensäure aus Serum in Abhängigkeit von der Menge des zugegebenen festen tertiären Kalziumphosphats (Fraenkel & Landau). Bei Versuch 1 und 2 mit 5 mg Bodenkörper wurde der Wert für Ca/P nicht angegeben, da die Abnahme des Gehaltes des Serums innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethoden lag.

Tabelle X.

Wirkung von festem tertiären Kalziumphosphat, Präparat Fraenkel & Landau, auf den Gehalt von Serum.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	pH	Ca mg%	P mg%	Ca/P ausgefällt	CO_2 mmol
0	--	7,72	10,1	3,2	--	23,8
1	5	7,72	9,9	3,2	--	23,5
2	5	7,70	9,9	3,1	--	23,4
3	20	7,69	9,0	2,8	2,8	23,1
4	20	7,70	9,0	2,7	2,2	23,0
5	200	7,64	7,3	2,1	2,5	22,7
6	200	7,64	7,0	2,0	2,5	22,7
7	2000	7,55	3,3	2,3	6,8	21,3

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.
Substratmenge: 25 ccm.
Ausführung unter Paraffin.

Tabelle XI gibt das Ergebnis der gleichen Versuchsreihe mit dem selbsthergestellten Kalziumphosphat wieder. Wie im Versuch mit Modellösung (Tabelle IV) trat auch im Serumversuch die Kohlensäureadsorption und die Hydrolyse des Bodenkörpers mit diesem Präparat stärker hervor.

Tabelle XI.

Wirkung von festem tertiären Kalziumphosphat, selbsthergestelltes Präparat, auf den Gehalt von Serum.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	pH	Ca mg%	P mg%	Ca/P ausgefällt	CO_2 mmol
0	--	7,32	12,0	3,5	--	23,2
1	20	7,27	10,4	2,9	2,7	22,8
2	200	7,02	9,5	4,9	--	21,8
3	2000	6,62	2,4	5,6	--	15,3

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.
Substratmenge: 25 ccm.
Ausführung unter Paraffin.

Tabelle XII zeigt, daß bei einer Versuchsreihe mit verschiedenen Mengen entfetteten Knochenpulvers als Bodenkörper die Wirkung auf die Zusammensetzung des Serums eine ähnliche ist. Die bei dem Knochenpulver im umgekehrten Sinne verlaufende Hydrolyse des Bodenkörpers machte sich bei Versuch 7 und 8 in der Zunahme des Kalziumgehaltes deutlich geltend. Bei Versuch 5 - 8 konnten keine Werte für den Phosphorgehalt des Serums angegeben werden, da bei der Phosphorbestimmung Trübungen eintraten. (Vergl.S.30).

Tabelle XII.

Wirkung von entfettetem Knochenpulver auf den Gehalt von Serum.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	pH	Ca mg%	P mg%	CO_2 mmol
0	--	7,71	10,1	1,8	23,8
1	5	7,69	10,0	1,7	23,3
2	5	7,73	10,0	1,7	23,4
3	20	7,62	9,1	1,4	23,2
4	20	7,66	8,6	1,3	23,1
5	200	7,61	5,5	--	21,9
6	200	7,61	5,6	--	22,0
7	2000	7,26	6,3	--	17,5
8	2000	7,47	5,9	--	17,5

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.
Substratmenge: 25 ccm.
Ausführung unter Paraffin.

Tabelle XIII zeigt die Hydrolyse des Bodenkörpers bei einem

Serumversuch. Das angewandte Serum war ein dialysiertes Pferdeserum mit auffallend niedrigem Gehalt an Kalzium und anorganischem Phosphor. Diese Versuchsreihe konnte daher den Lösungsversuchen im anorganischen Substrat zur Seite gestellt werden.

Tabelle XIII.

Lösungsversuche mit tertiärem Kalziumphosphat, Präparat Fraenkel und Landau, in dialysiertem Serum.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	pH	In Lösung gegangen: Ca mg%	P mg%	Ca/P
0	--	6,35	1,3	1,3	--
1	100	--	5,5	2,0	2,0
2	1000	--	5,6	1,1	1,1

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.
Substratmenge: 12 ccm.

Tabelle XIV zeigt die Wirkung von festem tertiären Kalziumphosphat (Fraenkel & Landau) auf den Gehalt von Serum, Serumultrafiltrat und Modellösung I. Die Versuche mit Ultrafiltrat beanspruchten große Serummengen; alle Ansätze wurden daher nur mit 12 ccm Substrat und 10, 100 und 1000 mg Bodenkörper ausgeführt. Da nur ein Makrokolorimeter zur Verfügung stand, verbrauchte die Phosphorbestimmung so große Mengen Substrat, daß keine

Tabelle XIV.

Wirkung von tertiärem Kalziumphosphat (Präparat Fraenkel und Landau) auf den Gehalt von Serum, Serumultrafiltrat und Modellösung I.

Nr.	Bodenkörpermenge in mg	Substrat	pH	Ca mg%	P mg%	Ca/P ausgefällt
01	--	12 ccm Serum	7,39	12,7	3,2	--
1	10	"		11,6	2,7	2,7
2	100	"		8,5	1,6	2,6
3	1000	"		3,7	1,4	5,0
02	--	12ccm Ultrafiltrat	7,65	7,1	2,8	--
4	10	"		4,3	1,7	2,5
5	100	"		2,1	0,9	2,6
6	100	"		2,7	1,1	2,6
7	1000	"		1,0	2,2	10,2
8	1000	"		1,1	2,1	8,6
03	--	12ccm Modellösg.I	7,65	5,6	3,2	--
9	10	"		2,3	1,7	2,2
10	100	"		1,4	1,5	2,5
11	1000	"		1,0	3,8	--

Schütteldauer: 20 Std. bei 38 Grad.
Ausführung unter Paraffin.

CO_2- und pH - Bestimmungen ausgeführt werden konnten. Zur Orientierung wurde pH vor dem Versuch bestimmt.- Die Versuchsreihe zeigt deutlich, daß die Verzögerung der Ausfällung, wie sie bei den Serumversuchen mit kleinen Mengen Bodenkörper beobachtet wurde, im Versuch mit Serumultrafiltrat nicht auftrat.

c) Versuche über die Wirkung verschiedener Adsorbentien auf den Gehalt von Serum und Modellösungen.

In Anlehnung an die Versuche von Benjamin (11) wurde nicht nur $BaSO_4$, sondern auch Kaolin, $Al(OH)_3$ und Al_2O_3 in größeren Mengen mit Serum und Modellösungen geschüttelt.

Kaolin wurde gereinigt, indem es mehrere Stunden mit konzentrierter Salzsäure, dann mit konzentrierter Natronlauge und zum Schluß nochmals mit konzentrierter Salzsäure ausgekocht wurde. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, das Kaolin nach dem Reinigungsprozeß gut auszuwaschen; zu diesem Zweck wurde es 8 Tage lang gewässert und das Wasser täglich mehrere Male erneuert. Das Kaolin wurde dann über Nacht bei 100 Grad im Trockenschrank getrocknet; bei einem Teil der Versuche war vorher das Kaolin im Platintiegel geglüht worden. -- $Al(OH)_3$ und Al_2O_3 kamen als käufliche Präparate zur Verwendung+); $BaSO_4$ wurde nach Vorschrift von Benjamin und Hess hergestellt.

Aus Tabelle XV ersieht man, daß die Adsorptionswirkung der einzelnen Adsorbentien sehr verschiedenartig ist und deshalb keinen Schluß auf das Vorhandensein einer negativ geladenen Kalziumverbindung zulassen. Bei den Versuchen mit Kaolin als Adsorbens wurde ferner beobachtet, daß gleichzeitig besonders große Mengen Flüssigkeit adsorbiert wurden. Ein relatives Maß für diese Wirkung gab folgende Untersuchung: Am Ende eines Adsorptionsversuches wurde der gesamte Inhalt der Schüttelgefässe möglichst vollständig in ein Zentrifugenglas übergeführt und vom Bodenkörper scharf abzentrifugiert. Die Menge des zurückgewonnenen Serums

---

+) Kahlbaum "zur Analyse".

stimmte bei Versuchen mit gleichem Adsorbens sehr gut überein, sie war aber bei den Versuchen mit Kaolin bedeutend erniedrigt, wie folgende Zahlen zeigen:

Versuch Nr.	Bodenkörper	zurückgewonnene Serummengen:
82a/3	$BaSO_4$	7,1
82a/4	"	7,1
82/3	Kaolin	5,6
82/4	"	5,6
82a/5	Kaolin, geglüht	5,0
82a/6	" "	4,8

T a b e l l e XV.

Wirkung verschiedener Adsorbentien auf den Gehalt von Serum und Modellösung II.

Nr.	Bodenkörper	Substrat	Vor dem Versuch Ca mg%	P mg%	Nach dem Versuch Ca mg%	P mg%	Ca/P
82a/3	4 g $BaSO_4$	10ccm Serum	11,2	4,2	6,7	0,7	1,3
82/4	" "	"	11,2	4,2	6,1	0,6	1,4
74/3	4 g Al_2O_3	"	9,0	2,8	3,9	1,1	2,4
74/4	" "	"	9,0	2,8	4,3	1,1	2,8
73/5	" "	"	12,0	3,5	4,8	0,8	2,7
74/5	4 g $Al(OH)_4$	"	9,0	2,8	8,4	2,4	1,5
74/6	" "	"	9,0	2,8	8,2	2,4	2,0
73/3	" "	"	12,0	3,5	8,9	2,6	3,4
82/3	4 g Kaolin	10ccm Serum	11,2	4,2	10,3	2,1	0,43
82/4	" "	"	11,2	4,2	10,5	2,1	0,33
82a/6	" "	"	11,2	4,2	10,6	3,8	--
82a/5	geglüht	"	11,2	4,2	10,8	4,1	--
78/2	4 g Al_2O_3	10ccm Modell-	5,0	3,2	2,6	--	--
78/3	4 g $Al(OH)_3$	lösung	5,0	3,2	1,8	1,6	2,9
81/1	4 g $BaSO_4$	"	5,6	3,2	3,1	0,4	0,9
81/2	" "	"	5,6	3,2	3,2	0,4	0,8

Schütteldauer: 6 Std. bei Zimmertemp.

Z u s a m m e n f a s s u n g .

Die Ergebnisse bisheriger Arbeiten über die Zustandsform des Kalziums im Serum wurden diskutiert und dabei festgestellt, daß die Versuche K l i n k e s zum Nachweis einer im Serum vorhan-

denen adsorbablen Kalziumkomplexverbindung, die für die Verkalkung maßgebend sein soll, als nicht beweisend angesehen werden müssen. Dazu wurden die K l i n k e schen Adsorptionsversuche mit verschiedenen festen Phasen in Serum und auch in Modellösungen wiederholt; die verschiedenartige Wirksamkeit einzelner Adsorbentien ließ keinen eindeutigen Schluß auf die Existenz einer Kalziumkomplexverbindung im Serum zu.

Daraufhin wurde erneut geprüft, ob ein größerer Anteil des ultrafiltrablen Serumkalziums in ionisierter Form vorläge und damit eine Übersättigung des Serums an den Knochensalzes anzunehmen sei. Dazu wurden Serum und übersättigte anorganische Modellösungen mit verschiedenen Mengen tertiären Kalziumphosphats als Bodenkörper unter Paraffinabschluß geschüttelt. Die dabei beobachtete Abnahme des Kalzium- und Phosphorgehaltes wies auf eine Übersättigung des Serums an tertiärem Kalziumphosphat hin, während die Abnahme der Kohlensäurekonzentration mit Adsorption von Karbonationen an den Bodenkörper erklärt werden konnte. Daher erfuhr nach Zugabe von festem Kalziumphosphat zu Serum und Modellösungen der Kohlensäuregehalt eine Verminderung, die nicht stöchiometrischen Gesetzmäßigkeiten entsprach.

Diese Adsorptionswirkung des tertiären Kalziumphosphats wurde zugleich als Ursache für die bisher unerklärbare Beobachtung von S e n d r o y und H a s t i n g s erkannt, die bei Gegenwart von festem Kalziumphosphat ein geringeres Löslichkeitsprodukt des Kalziumkarbonats feststellten als bei Gegenwart von festem Kalziumkarbonat. - Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wiesen ferner auf ein Adsorptionsvermögen von Knochenpulver gegenüber Karbonationen hin.

Der Befund bisheriger Arbeiten, daß die Zugabe von festem tertiären Kalziumphosphat zu Serum nur eine geringe Verminderung des Phosphorgehaltes bewirkt und daher eine Übersättigung des Serums an Kalziumphosphat abzulehnen sei, konnte auf folgende Weise erklärt werden. Das feste tertiäre Kalziumphosphat hat das Bestreben, in wässrigen Lösungsmitteln unter Lösung eines Überschusses an Phosphationen in ein basischeres Phosphat überzugehen. Je nach der Menge des zugesetzten tertiären Kalziumphosphats überlagert dieser Vorgang im Serum und in Modellösungen die Ausfällung von Phosphationen; auch zeigten tertiäre Kalziumphosphate verschiedener Herkunft hierin quantitative Unterschiede. - Weitere Untersuchungen über die Umwandlung des tertiären Kalziumphosphats in basischere Phosphate führten zu der Auffassung, daß bei einem bestimmten pH ein Kalziumphosphat bestimmter Zusammensetzung mit der Lösung im Gleichgewicht steht. Da Knochenpulver im Gegensatz

zu tertiärem Kalziumphosphat beim Zusammenbringen mit neutraler physiologischer Kochsalzlösung und mit leicht alkalischem Puffer einen Überschuß an Kalziumionen löste, konnte angenommen werden, daß die Knochen aus einem basischen Kalziumphosphat bestehen, an welches Kohlensäure adsorptiv gebunden ist. Im Einklang damit standen die röntgenspektroskopischen Untersuchungen von R o s e - b e r r y, H a s t i n g s und M o r s e, die die Abwesenheit von Kalziumkarbonat in den Knochen bewiesen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erfahrungen erweitern unsere Anschauungen über den Vorgang der Gewebsverkalkung in folgenden Punkten: Indem eine Übersättigung des Serums an tertiärem bezw. basischem Kalziumphosphat eindeutiger als bisher bewiesen und wichtige Gegenbeweise entkräftet werden konnten, läßt sich die Verkalkung der Gewebe auf eine Aufhebung dieses Übersättigungszustandes zurückführen; dabei konnten die Schüttelversuche mit Serum und festem tertiären Kalziumphosphat oder Knochenpulver als Modelle für die Verkalkung angesehen werden. - Das Produkt der Verkalkung besteht aus einem basischen Kalziumphosphat, dessen Fällung aus dem leicht alkalischen Serum erklärt werden konnte. Dieses basische Phosphat adsorbiert sekundär Kohlensäure. Daher ist bei Knochen nicht der Wert "Rest Ca/P" sondern der Wert "Gesamt Ca/P" für die Zusammensetzung des Kalziumphosphats maßgeblich. In Übereinstimmung damit gibt eine Überprüfung bisheriger Knochenanalysen eine weitgehende Konstanz der Werte "Gesamt Ca/P", während der Wert "Rest Ca/P" von K r a m e r bei frisch verkalkten Geweben mit geringem Kohlensäuregehalt erhöht gefunden wurde.

Literaturverzeichnis.

(1) Kleinmann, Bioch.Z., 196/98 (1928).
(2) Hofmeister, Ergebn.d.Physiol., 10/42 (1920).
(3) Holt, La Mer und Chown, J.biol.Chem., 64/509,567, (1925).
Holt, J.biol.Chem., 64/579 (1925).
(4) Howland, Ergebn.d.Physiol., 25/517 (1910).
(5) Shear und Kramer, J.biol.Chem., 79/105,121,125,147 (1928).
(6) Freudenberg und György,Bioch.Z.110/299,(1920),115/96 (1921), 118/50 (1921),121/131,142 (1921),124/299 (1921).
(7) Hastings, Murray und Sendroy, J.biol.Chem.71/723 (1927).
Hastings und Sendroy, J.biol.Chem., 71/783,797 (1927).
(8) Klinke,Ergebn.d.Physiol.26/235 (1928);Bioch.Z.213/177 (1928); Klin.Wochenschr. 17/791 (1927).
(9) Rona und Takahashi, Bioch.Z. 31/336 (1911).
(10) Greenberg und Gunther, J. biol. Chem. 85/493 (1929-30).
(11) Benjamin und Hess, J.biol.Chem. 100/27 (1933).
(12) Greenwald, J.biol.Chem. 54/285 (1922); 59/1 (1924);67/1 (1926).
Greenwald und Gross, J.biol.Chem.66/185,201 (1925); 68/325 (1926).
(13) Gordon,Hugh,Whitehead und Wormhall,Bioch.J.20/1028 (1926).
(14) Bernhard und Beaver, J.biol.Chem.69/113 (1926).
(15) D.M.Greenberg und L.Greenberg, J.biol.Chem.94/1 (1932).
(16) Sekera, Kolloid-Z. 28/254.
(17) Warington, J.chem.Soc. 26/983 (1873).
(18) Rindell, Compte Rend. 134/112 (1902).
Rindell, Untersuchungen über die Löslichkeit einiger Kalkphosphate, Helsingfors, 1900.
(19) Buch, Z.anorg.Chem. 52/325 (1907).
(20) Cameron und Bell, J.Amer.Chem.Soc. 27/1512 (1905).
(21) Wendt und Clark, J.Amer.Chem.Soc. 45/881 (1923).
(22) Roseberry, Hastings und Morse, J.biol.Chem.90/395 (1931).
(23) Domontovitsch und Sarubina, Bioch.Z. 163/464 (1925).
(24) Gabriel, Z.physiol.Chem. 18/275 (1894).
(25) Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie, Berlin 1877.
(26) Werner, Ber.d.chem.Ges. 40/4441 (1907).
(27) Gassmann, Z.physiol.Chem. 178/67 (1928).
(28) Dhar, J.biol.Chem. 85/493 (1929-30).
(29) Irving,J.biol.Chem.68/239 (1926).
(30) Pauli und Samec, Bioch.Z. 17/235 (1909).
(31) Brinkman und van Dam,Proc.K.Akad.Wetensch.Amsterdam,23/762 (1920). Brinkman, Bioch.Z. 95/101 (1919).

(32) Freudenberg und Budde, Z.ges.exp.Med.42/284 (1924).
(33) Haffner und Simon, Archiv exp.Path.u.Pharmak.109/129 (1925).
(34) Cortus und Esterman, Z.physik.Chem. 136/228 (1928).
(35) Trendelenburg, Pflügers Arch.f.d.ges.Physiol.199/237 (1923).
(36) Rona, Praktikum d.physiol.Chem. I.Bd., S.6.(1926).
(37) Michaelis, Bioch.Z. 234/139 (1931).
(38) Cullen, J.biol.Chem. 52/501 (1922).
(39) Greenberg, J.biol.Chem. 71/91 (1927); 82/549 (1929).
(40) Stanford und Wheatley, Bioch.J.19/710 (1925).
(41) van Slyke, in "Abderhalden, Hdbch.d.biol.Arbeitsmethoden,IV, 4/1245 (1926).
(42) Fiske und Subbarow, J.biol.Chem. 66/375 (1925).
(43) Lohmann und Jendrassik,Bioch. Z.178/418 (1926).
(44) Bell und Doisy, J.biol.Chem. 44/55 (1920).

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Rößle als dem Direktor des Pathologischen Instituts des Charité-Krankenhauses für die bereitwillige Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie der Laboratoriumshilfsmittel meinen ergebensten Dank abzustatten.

L e b e n s l a u f .

Ich, Dorothea Hofmann, wurde am 2.Februar 1905 als Tochter des Pfarrers Rudolf Hofmann in Leipzig geboren und besuchte daselbst von Ostern 1911 an zunächst die Büttnersche Privatschule, später die I. Höhere Mädchenschule und Studienanstalt, die ich Ostern 1924 mit dem Reifezeugnis verließ. Von Sommersemester 1924 an studierte ich exakte Naturwissenschaften und Mathematik an der Universität Leipzig, legte im Sommersemester 1926 und im Sommersemester 1927 die beiden Teile der Verbandsprüfung für Chemiker ab und bereitete mich in der Folgezeit auf das Staatsexamen fürs Höhere Lehramt vor.Am 6.Mai 1930 bestand ich diese Prüfung an der Universität Leipzig; ich erhielt die Lehrberichtigung für Chemie, Physik und Mathematik. Nach Ableistung des Vorbereitungsdienstes an Höheren Mädchenschulen und Studienanstalten in Plauen und Leipzig begann ich im Juli 1932 mit der experimentellen Bearbeitung meiner Doktorarbeit in der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts des Charité-Krankenhauses unter Leitung von Herrn Privatdozent Dr. Kleinmann. Nach dessen Beurlaubung im März 1933 und nach der Beurlaubung des Abteilungsvorstandes, Herrn Professor Rona am 1. Mai 1933 führte ich meine Arbeit selbständig weiter und schloß sie im Dezember 1933 ab.